



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Comportamento biológico “in vitro” de “novas espécies” de
Leishmania no Velho Mundo

Andreia Filipa Ramos Ribeiro de Lemos Albuquerque

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS

DEZEMBRO, 2013



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Comportamento biológico “in vitro” de “novas espécies” de *Leishmania* no Velho Mundo

Autor: Andreia Filipa Ramos Ribeiro de Lemos Albuquerque

Orientador: Doutora Sofia Cortes

Co-orientador: Professora Doutora Lenea Campino

Arguente: Professor Doutor Ricardo Silvestre

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, realizado no Grupo de Leishmanioses da Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica, sob a orientação científica da Doutora Sofia Cortes e da Professora Doutora Lenea Campino, pela Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projecto PTDC/CVT/112371/2009.

PUBLICAÇÕES

Artigos

A. Albuquerque, L. Campino, S. Cortes. 2012. *In vitro biological behavior of Leishmania infantum/L. major hybrid strains from Mediterranean basin, Portugal*. In XI European Multicolloquium of Parasitology, V. Cosma (Ed.), Medimond International Proceedings, Bolonha, pp. 5-9.

Comunicações em congressos

A. Albuquerque, S. Cortes, L. Cardoso, L. Campino. 2013. *Evaluation of different PCR protocols for the detection of Leishmania DNA in the diagnosis of canine leishmaniasis*. WorldLeish 2013, Porto de Galinhas, Brazil. P503.

A. Albuquerque, L. Campino, S. Cortes. 2013. *Susceptibilidade de estirpes de Leishmania spp. do Velho Mundo à Anfotericina B - Resultados preliminares*. 2º Congresso Nacional de Medicina Tropical, Lisbon, Portugal.

S. Cortes, **A. Albuquerque**, J. Canudo, L. Campino. 2012. *In vitro biological behavior of Leishmania infantum, L. major and L. major hybrids from Mediterranean basin*. XI European Multicolloquium of Parasitology (EMOP XI), Cluj-Napoca, Roménia. p. 408-9.

A. Albuquerque, L. Campino, S. Cortes. 2012. *Estudos fenotípicos de estirpes híbridas de Leishmania sp. Do Velho Mundo*. XVI Congresso Português de Parasitologia, Lisbon, Portugal, Acta Parasitológica Portuguesa, 19, adenda.

Dog, Nanci e Hari, desde 1991
Três gerações de amor, companheirismo e lealdade.
Nunca vos esquecerei. Esta tese existe porque vocês existiram

AGRADECIMENTOS

“If I have seen further than others, it is by standing upon the shoulders of giants.”

Isaac Newton

À minha orientadora e amiga Doutora Sofia Cortes que me respondeu ao meu e-mail para estágio de licenciatura e me abriu as portas para o paraíso das leishmanioses! Deu-me a oportunidade de conhecer e sonhar com a cura para a leishmaniose. Partilhou os seus vastos conhecimentos científicos, ensinou-me o que significa dedicação e deu-me asas para voar.

À Professora Doutora Lenea Campino agradeço a disponibilidade, a dedicação nas revisões e análise dos resultados, artigos, posters, candidaturas, projetos e até nas revisões de caráter, responsabilidade e conduta científica. Contribuiu e continua a contribuir, sem dúvida alguma, para o desenvolvimento das ferramentas essenciais para a minha atual e futura carreira científica.

Ao Professor Doutor Luís Cardoso, pelo envio das amostras caninas de sangue medular e pela disponibilidade sempre imediata para discutir todos resultados e esclarecer toda e qualquer questão.

À Doutora Carla Maia agradeço a amizade, a grande partilha de saberes, especialmente sobre leishmaniose felina e flebótomos!

Ao José Cristovão e à Cláudia Ramos, pela partilha de conhecimentos e por todo o apoio prestado.

A todos os meus colegas do VI Mestrado de Ciências Biomédicas, por todo o companheirismo! Um especial abraço às minhas “irmãs” Esmeralda e Elsa, que me ensinaram que a verdadeira amizade transcende continentes! Um obrigado ao cubo à pequena grande Maria Carvalho, pela sua dedicação na nos nossos trabalhos “paralelos”!

Aos estagiários Geraldina Manjate e Tiago Nunes, pela ajuda nos ensaios “in vitro” de suscetibilidade à Anfotericina e infeção de linhas celulares. À Liliana Lopes por ser a minha “mão direita” nas extrações de DNA e na polimerização de géis de última hora!

A todos os docentes residentes e convidados do IHMT-UNL, pelo ensino de excelência que me permitiu chegar a esta dissertação hoje.

Um especial agradecimento à Professora Doutora Luzia Gonçalves pela disponibilidade na análise estatística de alguns dos resultados desta tese, que apesar de ter a sua agenda sempre preenchida, conseguiu ajudar-me imenso!

Um obrigado GIGANTE ao Carlos Rodrigues por toda a ajuda informática durante este percurso!

À minha incansável e inestimável família e amigos. Sem eles nada disto era possível. Agradeço o apoio, a oportunidade de desenvolver os meus interesses e experimentar a vida. Já disse e não me canso de repetir, os vossos valores cresceram exponencialmente em mim.

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas pelo parasita protozoário *Leishmania* sp. Na Bacia mediterrânica, *Leishmania infantum*, é a principal espécie causadora de leishmaniose visceral, a forma mais severa da doença, sendo *L. major* um dos agentes etiológicos da leishmaniose cutânea. Apesar de se considerar que estes parasitas têm uma reprodução essencialmente clonal, nos últimos 20 anos tem vindo a ser descrita a recombinação genética entre diferentes estirpes e espécies, com ocorrência de híbridos naturais, quer no Velho quer no Novo Mundo. Recentemente, em Portugal, foram isoladas e identificadas pela primeira vez, estirpes híbridas de *L. infantum/L. major*.

O presente estudo teve como principais objetivos, a pesquisa de “novas espécies” de *Leishmania* e a análise do comportamento “in vitro” de estirpes parentais e híbridas de *L. infantum* e *L. major*.

Numa primeira parte do trabalho efetuou-se a cultura e pesquisa de DNA de *Leishmania* sp., em amostras de sangue medular de 229 cães provenientes de uma região endémica de Portugal, utilizando diferentes marcadores moleculares (kDNA, ITS1 e SSU rRNA) e protocolos de PCR. Não foi encontrado DNA de espécies híbridas, tendo-se no entanto, identificado DNA de *Leishmania* sp. em 45,85% (105/229) das amostras, incluindo cães sem sinais clínicos.

Na segunda parte do trabalho, realizaram-se diversos ensaios “in vitro” com estirpes híbridas naturais *L. infantum/L. major* e parentais *L. infantum* e *L. major*. Em condições normais de crescimento, observou-se um padrão de crescimento distinto para cada estirpe estudada. Em condições de “stress” oxidativo, destacou-se uma diferença significativa entre as duas estirpes híbridas estudadas. Em condições de “stress” nutricional, as estirpes não apresentaram diferenças entre si. Após avaliação da suscetibilidade das estirpes na presença de Anfotericina B, todas se mostraram suscetíveis, com concentrações inibitórias (CI₅₀) entre 0.21 e 1.15 µg/mL. Após infeção em linhas celulares monocíticas, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na taxa e intensidade de infeção das estirpes híbridas em comparação às putativas parentais.

Os resultados obtidos, contribuíram para um melhor conhecimento sobre o comportamento biológico destas estirpes híbridas naturais *L. infantum/L. major*. Estas demonstraram um comportamento “in vitro” intermédio, relativamente às estirpes parentais. Estes resultados poderão servir de base para o desenvolvimento de outros estudos com estas “novas espécies”, nomeadamente estudos de patogenicidade “in vivo” e o papel de biomarcadores de virulência, que permitam um potencial prognóstico da infeção e avaliação do seu risco epidemiológico.

Palavras-chave: Leishmaniose, Híbridos, *L. infantum*, *L. major*, *L. infantum/L. major*.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of diseases caused by the protozoan parasite *Leishmania* sp. In the Mediterranean Basin, *Leishmania infantum* is the main species causing visceral leishmaniasis, the most severe form of the disease, while *L. major* is one of the etiological agents of cutaneous leishmaniasis. Although it is considered that these parasites have essentially clonal reproduction, in the last 20 years it has been described genetic recombination between different strains and species, with occurrence of natural hybrids in the Old and New World. Recently, in Portugal, for the first time, hybrid strains of *L. infantum*/*L. major* were isolated and identified.

The main goals of the present study were the search of "new species" of *Leishmania* and the "in vitro" behavior analysis of hybrid and parental strains of *L. infantum* and *L. major*.

In the first part of the work, sample culture and search of *Leishmania* sp. DNA in 229 canine bone marrow blood samples were performed, from an endemic region of Portugal, using different molecular markers (kDNA, ITS1 and SSU rRNA) and PCR protocols. No DNA of hybrid species was found, although it has been identified *Leishmania* sp. DNA in 45.85% (105/ 229) of samples including dogs with no clinical signs.

In the second part of the work, several "in vitro" tests were performed, using both, natural hybrid *L. infantum*/*L. major* and parental *L. infantum*, *L. major* strains. In normal growth conditions, a distinct growth pattern for each strain studied was observed. Under oxidative stress conditions, the highlight was a significant difference between the two hybrid strains studied. Under nutritional stress, the strains showed no differences. After in vitro susceptibility to Amphotericin B, all strains were susceptible, with inhibitory concentrations (IC₅₀) between 0.21 and 1.15 µg/mL. After infection of monocytic cell lines, no statistically significant differences were observed in the rate and intensity of infection of the hybrid strains in comparison to the putative parents.

The obtained results contributed to a better understanding of the biological behavior of these natural hybrid *L. infantum*/*L. major* strains. They demonstrated an intermediate "in vitro" behavior compared to their parental strains. These results may serve as a basis for the development of other studies with these "new species", namely "in vivo" pathogenicity studies and the role of known virulence biomarkers, allowing a potential prognostic of infection and evaluation of its epidemiological risk.

Key-words: Leishmaniasis, Hybrids, *L. infantum*, *L. major*, *L. infantum*/*L. major*.

ÍNDICE

PUBLICAÇÕES	i
DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABELAS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
OBJETIVOS	xxi
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	
1. Etiologia e Nota histórica	1
2. Epidemiologia	2
2.1. Formas clínicas	5
2.1.1. Leishmaniose visceral	5
2.1.2. Leishmaniose cutânea	7
2.1.3. Leishmaniose mucocutânea	10
2.2. Leishmaniose em Portugal	11
3. Parasita	13
3.1. Morfologia	13
3.2. Ciclo de vida	15
3.3. Genoma	17
3.4. Híbridos de <i>Leishmania</i> spp	18
4. Hospedeiro	19
4.1. Vetor – Hospedeiro invertebrado	19
4.2. Reservatório – Hospedeiro vertebrado	20
5. Interação parasita-hospedeiro	22
6. Métodos de diagnóstico laboratorial	24
6.1. Diagnóstico direto	24
6.1.1. Métodos parasitológicos	24
6.1.2. Métodos moleculares	25
6.2. Diagnóstico indireto	26

7. Estudos “in vitro”	26
8. Terapêutica em Leishmaniose	27

CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS

1. Pesquisa de “novas espécies” de <i>Leishmania</i>	31
1.1. Amostras biológicas	31
1.2. Exame parasitológico cultural	31
1.3. Detecção de DNA de <i>Leishmania</i>	32
1.3.1. Extração de DNA	32
1.3.2. Controlo de extração de DNA	32
1.3.3. Reação em cadeia da polimerase - PCR	33
1.3.4. Visualização dos produtos de PCR	37
1.4. Genotipagem	37
1.5. Visualização dos produtos de MC-PCR-RFLP	38
2. Ensaios “in vitro” de estirpes parentais e híbridas de <i>Leishmania</i>	38
2.1. Estirpes de <i>Leishmania</i>	38
2.2. Ensaios “in vitro” com promastigotas de <i>Leishmania</i>	39
2.2.1. Dinâmicas de crescimento e densidades parasitárias	39
2.2.2. Avaliação de “stress” oxidativo	41
2.2.3. Avaliação de “stress” nutricional	42
2.2.4. Suscetibilidade “in vitro” de <i>Leishmania</i> spp. a Anfotericina B	43
2.2.4.1. Avaliação da suscetibilidade dos parasitas	43
2.2.4.2. Avaliação da citotoxicidade e do índice de seletividade	44
2.3. Ensaios “in vitro” com amastigotas de <i>Leishmania</i>	45
2.3.1. Linhas celulares	45
2.3.2. Diferenciação de linhas celulares	45
2.3.3. Infecção de linhas celulares	47
2.4. Análise estatística	48

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Pesquisa de novas espécies de <i>Leishmania</i>	49
1.1. Exame parasitológico cultural	49
1.2. Detecção de DNA de <i>Leishmania</i>	49
1.3. Genotipagem	55
2. Ensaios “in vitro” de estirpes parentais e híbridas de <i>Leishmania</i>	57
2.1. Ensaios “in vitro” com promastigotas de <i>Leishmania</i>	57
2.1.1. Dinâmicas de crescimento e densidades parasitárias	57
2.1.2. Avaliação de “stress” oxidativo	62
2.1.3. Avaliação de “stress” nutricional	64
2.1.4. Suscetibilidade “in vitro” de <i>Leishmania</i> spp. à Anfotericina B	66
2.1.4.1. Avaliação da suscetibilidade dos parasitas	66
2.1.4.2. Avaliação da citotoxicidade e do índice de seletividade	69
2.2. Ensaios “in vitro” com amastigotas de <i>Leishmania</i>	70
2.2.1. Diferenciação de linhas celulares	70
2.2.2. Infecção de linhas celulares	72

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES	77
---------------------------------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
-----------------------------------	----

ANEXOS	99
---------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica de Leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundos	5
Figura 2. Caso típico de Leishmaniose visceral com malnutrição e hepatoesplenomegalia.....	7
Figura 3. Distribuição geográfica de Leishmaniose cutânea no Velho e Novo Mundos	9
Figura 4. A) Caso típico de Leishmaniose cutânea localizada, B) Caso típico de Leishmaniose cutânea difusa.....	10
Figura 5. Caso típico de Leishmaniose mucocutânea	11
Figura 6. Formas amastigotas de <i>Leishmania</i>	14
Figura 7. Formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	15
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	16
Figura 9. Fêmeas flebotomíneas após refeição sanguínea.....	20
Figura 10. Sinais clínicos de leishmaniose canina.....	22
Figura 11. Representação de um hemacitômetro.....	40
Figura 12. Esquema da placa de 24 poços com a disposição das estirpes estudadas.....	40
Figura 13. Esquema da placa de 96 poços com disposição das concentrações de H ₂ O ₂ utilizadas.	42
Figura 14. Esquema da placa de 96 poços com disposição das concentrações de Anfotericina B utilizadas.	44
Figura 15. Lâminas com câmara de 8 poços.....	46
Figura 16. Coloração de lâminas com Giemsa.....	47
Figura 17. Produtos de amplificação, obtidos com os quatro protocolos de PCR...	51
Figura 18. Produtos de amplificação de SSU rRNA Nested-PCR.....	54
Figura 19. Produtos de restrição de MC-PCR-RFLP.....	56
Figura 20. Árvore filogenética contendo genótipos encontrados em diferentes estirpes de <i>L. infantum</i> e <i>L. donovani</i> isoladas a partir dos hospedeiros humano e canino e vetor.	57
Figura 21. Dinâmicas de crescimento das estirpes parentais <i>L. infantum</i> (IMT 151 e IMT 316), <i>L. major</i> (LEM 2164) e híbridas <i>L. infantum/L. major</i> (IMT 208 e IMT 211).	59

Figura 22. Comprimento médio dos corpos celulares das estirpes parentais <i>L. infantum</i> (IMT 151 e IMT 316), <i>L. major</i> (LEM 2164) e híbridas <i>L. infantum/L. major</i> (IMT 208 e IMT 211) em condições normais de crescimento.....	61
Figura 23. Resultado de um ensaio com H ₂ O ₂ revelado pelo método de XTT.....	62
Figura 24. Efeito do peróxido de hidrogénio nas estirpes de <i>L. infantum</i> (IMT 151 e IMT 316), <i>L. major</i> (LEM 2164) e híbridas <i>L. infantum/L. major</i> (IMT 208 e IMT 211).	63
Figura 25. Dinâmicas de crescimento das estirpes parentais <i>L. infantum</i> (IMT 151 e IMT 316), <i>L. major</i> (LEM 2164) e híbridas <i>L. infantum/L. major</i> (IMT 208 e IMT 211) sob condições de depleção de nutrientes do meio de cultura.....	65
Figura 26. Resultado de um ensaio de suscetibilidade com Anfotericina B revelado pelo método de MTT.....	66
Figura 27. Representação gráfica dos CI ₅₀ médios obtidos para as estirpes de <i>Leishmania</i> estudadas.	67
Figura 28. Tempos de incubação para otimização de diferenciação da linha celular U-937.	71
Figura 29. Tempos de incubação para otimização de diferenciação da linha celular RAW 264.7.	72
Figura 30. Taxas de infeção das diferentes estirpes de <i>Leishmania</i> utilizadas, nas linhas celulares RAW 264.7 e U-937.....	73
Figura 31. Intensidades de infeção das diferentes estirpes de <i>Leishmania</i> utilizadas, nas linhas celulares RAW 264.7 e U-937.....	74
Figura 32. Macrófagos diferenciados da linha celular U-937, infetados com <i>Leishmania</i> spp. (A=1000x).	75
Figura 33. Macrófagos diferenciados da linha celular RAW 264.7, infetados com <i>Leishmania</i> spp. (A=1000x).	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de Leishmaniose cutânea e Leishmaniose visceral no Velho Mundo, distribuição geográfica, hospedeiros invertebrados e vertebrados.....	3
Tabela 2. Principais espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de Leishmaniose cutânea e Leishmaniose visceral no Novo Mundo, distribuição geográfica, hospedeiros invertebrados e vertebrados.....	4
Tabela 3. Condições de amplificação do gene da β -actina (canina).....	33
Tabela 4. Sequência dos “primers” utilizados para amplificação de DNA de <i>Leishmania</i> spp.....	34
Tabela 5. Condições de amplificação com as “primers” MC1 e MC2.....	34
Tabela 6. Condições de amplificação com as “primers” LITSR e L5.8S.....	35
Tabela 7. Condições de amplificação com as “primers” Uni21 Lmj4.....	35
Tabela 8. Condições de amplificação com as “primers” R221 e R332 (1º PCR).....	36
Tabela 9. Condições de amplificação com as “primers” R223 e R333 (2º PCR).....	36
Tabela 10. Estirpes de <i>Leishmania</i> utilizadas.....	39
Tabela 11. Percentagens de meio de cultura Schneider em PBS (v/v).....	43
Tabela 12. Amostras positivas com os diferentes protocolos de PCR na presença/ausência de sinais clínicos de Leishmaniose canina (n=229).....	52
Tabela 13. CI ₅₀ de Anfotericina B obtidas com as estirpes de <i>Leishmania</i> estudadas	68
Tabela 14. Índices de seletividade de Anfotericina B das estirpes de <i>Leishmania</i> ...	69
Tabela 15. Intensidades de infecção das diferentes estirpes de <i>Leishmania</i>	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AnfB	Anfotericina B
CI	Concentração inibitória
CIE	Contraímunoeletroforese
DAT	Técnica de aglutinação direta, do inglês “direct agglutination test”
DGS	Direção Geral de Saúde
DL	Dose Letal
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês “enzyme-linked-immunosorbent assay”
Gp63	Glicoproteína de 63 Kilo Dalton
IC	Concentração inibitória, do inglês “inhibitory concentration”
IFI	Imunofluorescência indireta
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
IS	Índice de seletividade
ITS	Espaçadores internos transcritos, do inglês “internal transcribed spacers”
kDNA	DNA cinetoplastideal
LC	Leishmaniose cutânea
Lcan	Leishmaniose canina
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano, do inglês “lipophosphoglycan”
LV	Leishmaniose visceral
Mb	Megabases
MLEE	Do inglês “Multilocus enzyme electrophoresis”
NNN	“Novy-MacNeal-Nicolle”
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês “phosphate-buffered saline”
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês “polymerase chain reaction”
PMA	Do inglês “Phorbol myristic acid”
RFLP	Hidrólise por endonucleases de restrição, do DNA amplificado, do inglês “restriction fragment length polymorphism”
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês “reactive oxygen species”

RPMI	Meio de cultura líquido, do inglês “Roswell Park Memorial Institute”
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal, do inglês “ribosomal ribonucleic acid”
SFB	Soro fetal bovino
sida	Síndrome da imunodeficiência adquirida
s.l.	<i>Sensu lato</i>
SSU	Pequena subunidade, do inglês “Small subunit”
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
UTAD	Universidade de Trás-os-Montes e Alto-Douro
VIH	Vírus da imunodeficiência humana

OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal, a identificação de “novas espécies” de *Leishmania* e a análise do comportamento “in vitro” de estirpes parentais e híbridas de *Leishmania infantum* e *L. major*.

Como objetivos específicos pretendeu-se:

- Pesquisar a presença de parasitas *Leishmania* sp. em amostras de sangue medular canino, através de cultura e diferentes protocolos de PCR;
- Comparar “in vitro” as estirpes parentais e híbridas de *Leishmania* em termos de *i*) padrões de crescimento, *ii*) viabilidades parasitárias sob condições de “stress” oxidativo, *iii*) “stress” nutricional.
- Comparar a suscetibilidade “in vitro” das estirpes parentais e híbridas de *Leishmania* ao fármaco Anfotericina B.
- Avaliar a citotoxicidade da Anfotericina B em linha celular monocítica e determinar o índice de seletividade para as estirpes estudadas.
- Comparar as taxas e intensidades de infecção “in vitro” das estirpes parentais e híbridas de *Leishmania*.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1. Etiologia e Nota Histórica

Devido ao seu pequeno tamanho, não foi possível reconhecer a existência de protozoários até à invenção e utilização do microscópio por Antoine van Leeuwenhoek, no final do século XVII. O estudo destes parasitas, só começou verdadeiramente cerca de dois séculos mais tarde, após a descoberta das bactérias e o estabelecimento da teoria dos germes de Pasteur e seus colaboradores no final do século XIX (Cox, 2002).

Na entrada do século XIX os investigadores Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna, identificaram independentemente o parasita causador das leishmanioses, ao qual Ronald Ross atribuiu em 1903 o nome genérico de *Leishmania* (WHO, 2010a).

Naturalmente, as infeções por *Leishmania* já existiam muito antes da identificação formal do agente causal. Em documentos, pinturas e esculturas antigas, em alguns casos datados de 2500 a.C., é indiciada a presença daquilo que hoje se acredita tratar de lesões cutâneas e sinais de leishmaniose (Cox, 2002).

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários intracelulares da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do género *Leishmania* Ross, 1903. Estes parasitas infetam o sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro mamífero e são transmitidos através da picada de insetos vetores flebotomíneos da família Psychodidae, género *Phlebotomus* Rondani, 1843 ou *Lutzomyia* França, 1924.

A procura do vetor de transmissão foi longa, tendo apenas no início dos anos 20 sido demonstrado experimentalmente o potencial de transmissão do género *Phlebotomus* pelos irmãos Sergent (Sergent et al, 1921) no Velho Mundo, e em 1922 o género *Lutzomyia* no Novo Mundo (citado por Cox, 2002). O verdadeiro mecanismo de transmissão – a picada do flebótomo – foi apenas demonstrado em 1941 (Adler et al, 1941).

2. Epidemiologia

Presentemente, estima-se que 350 milhões de indivíduos de 98 países em todo o mundo, estejam em risco de contrair a doença. A incidência anual de novos casos estima-se ser entre os 0,2 e 1,2 milhões. Em numerosos países subdesenvolvidos, esta parasitose continua a ser um problema de saúde pública, constituindo a 9ª maior causa de doença do grupo das doenças infecciosas (Alvar 2012; Desjeux, 1999).

O género *Leishmania* inclui cerca de 30 espécies diferentes, a maioria das quais infeta humanos, sendo responsáveis por várias formas da doença, sendo as mais frequentes leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (Tabelas 1 e 2).

As espécies de *Leishmania* circulam em focos naturais de infeção, onde um inseto fêmea hematófago, atuando como vetor – flebótomo - e um reservatório – mamífero – coexistem. A distribuição geográfica destas doenças está relacionada, por um lado, com as espécies de flebotomíneos na qualidade de vetores e, por outro, com a sua bioecologia e condições de desenvolvimento interno do parasita (Dedet e Pratlong, 2003).

Tabela 1 – Principais espécies de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose visceral e Leishmaniose cutânea no Velho Mundo, distribuição geográfica, hospedeiros invertebrados e vertebrados (Adaptado de: Dedet e Pratlong, 2003; Desjeux, 1992).

Espécies	Tipo de doença	Distribuição geográfica	Hospedeiro invertebrado	Hospedeiro vertebrado
<i>L. infantum</i>	LV, LC	Bacia Mediterrânea, Norte de África, Ásia Central, Noroeste da China		Cães, Gatos e Humanos
<i>L. donovani</i>	LV	Índia, Paquistão, Oeste da China, Sudão, Somália, Etiópia e Quênia		Humanos, Roedores e Gado
<i>L. major</i>	LC	Norte de África, Médio Oriente, Península Arábica, Quênia, Sudão e Índia	<i>Phlebotomus</i> spp.	Roedores
<i>L. tropica</i>	LC	Bacia Mediterrânea, Afeganistão, Norte de África, Médio Oriente, Índia e Paquistão		Humanos
<i>L. aethiopica</i>	LC	Etiópia, Quênia e Uganda		Roedores

LV, Leishmaniose Visceral; LC, Leishmaniose Cutânea. Na tabela, estão apenas referidas as espécies mais comuns de importância médico-veterinária.

Tabela 2 – Principais espécies de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose visceral e Leishmaniose cutânea no Novo Mundo, distribuição geográfica, hospedeiros invertebrados e vertebrados (Adaptado de: Dedet e Pratlong, 2003; Desjeux, 1992).

Espécies	Tipo de doença	Distribuição geográfica	Hospedeiro invertebrado	Hospedeiro vertebrado
<i>L. infantum</i>	LV	América Central e do Sul		Canídeos e Humanos
<i>L. mexicana</i>	LC	América Central, do Sul e regiões do Sul dos EUA		Roedores, Canídeos
<i>L. amazonensis</i>	LC, LMC	América do Sul		Roedores e Marsupiais
<i>L. braziliensis</i>	LC, LMC	América Central e do Sul		Roedores, Canídeos e Cavalos
<i>L. peruviana</i>	LC, LMC	América do Sul	<i>Lutzomyia</i> spp.	Canídeos e Roedores
<i>L. lainsoni</i>	LC	América do Sul		Roedores
<i>L. naiffi</i>	LC	América do Sul		Tatus
<i>L. shawi</i>	LC	América do Sul		Primatas e Preguiças
<i>L. guyanensis</i>	LC, LMC	América do Sul		Preguiças, Roedores e Marsupiais
<i>L. panamensis</i>	LC, LMC	América do Sul		Preguiças, Primatas, Canídeos, Roedores e Marsupiais

LV, Leishmaniose Visceral; LC, Leishmaniose Cutânea; LMC, Leishmaniose Mucocutânea; EUA, Estados Unidos da América. Na tabela, estão apenas referidas as espécies mais comuns de importância médico-veterinária.

2.1. Formas clínicas

A expressão clínica das leishmanioses está relacionada com o tropismo das espécies de parasitas e depende não só do potencial genotípico destes, mas também do estado imunológico do hospedeiro.

2.1.1. Leishmaniose visceral

A LV, também conhecida como Kala-azar (febre negra), foi inicialmente descrita no final do século XIX, na Índia e é a forma mais severa da doença, sendo responsável por cerca de 40.000 mortes anuais (Alvar et al, 2012; Laveran e Mesnil, 1903).

Encontra-se em 54 países, sendo que mais de 90% dos casos globais de LV ocorrem em 6 principais países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sul do Sudão, Brasil e Etiópia (Figura 1). A incidência anual de novos casos estima-se ser entre os 0,2 e 0,4 milhões.

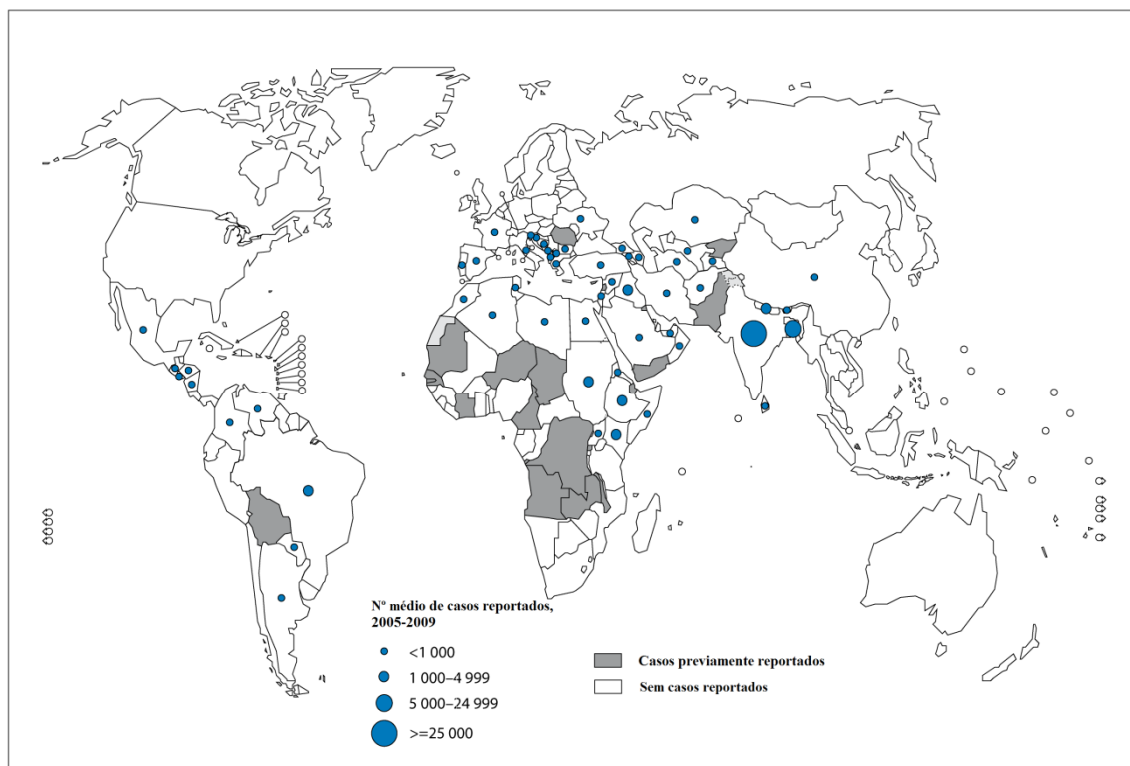


Figura 1 – Distribuição geográfica de Leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundos (Adaptado de: WHO, 2010b).

L. infantum e *L. donovani* são os agentes causadores de LV. Na Bacia Mediterrânea, Norte de África, Ásia Central e Noroeste da China as infecções são causadas por *L. infantum* e os cães representam o principal reservatório, apesar de existirem algumas descrições que a infecção pode ocorrer em cães selvagens no Médio Oriente, em raposas no sul da Europa (Abranches et al, 1986) e norte de África (Dedet e Pratlong, 2003) e chacais na Ásia (Hamidi et al, 1982).

Na Bacia mediterrânica, *L. infantum* zimodeme MON-1 é o agente mais comum de LV humana e leishmaniose canina (Lcan) (Pratlong et al, 2004; Gramiccia et al, 1992). A identificação e diferenciação de espécies e sub-espécies de *Leishmania* em zimodemes, através da tipagem isoenzimática, é, presentemente, a forma “standard” de classificação universalmente aceite. Este tipo de classificação tem por base a mobilidade eletroforética de isoenzimas onde os grupos de isolados de *Leishmania* com o mesmo perfil isoenzimático se designam por zimodemes (Rioux et al, 1990). O reagrupamento de estirpes *Leishmania* em zimodemes, assinaladas como unidades taxonómicas operacionais, permite o cálculo de índices de similaridade e proximidade filogenéticas.

L. donovani está presente na Índia, Paquistão, Oeste da China, Sudão, Somália, Etiópia e Quênia. A sua transmissão é essencialmente antroponótica, apesar do gado e roedores poderem funcionar como reservatórios do parasita (Dedet e Pratlong, 2003; Lainson e Shaw, 1987).

No Novo Mundo o único agente causador de LV é *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) (Maurício et al, 1999) e encontra-se na América Central e na América do Sul, particularmente em zonas rurais, onde o cão atua como principal reservatório.

Ao longo de toda a sua área de distribuição, a LV causada por *L. infantum*, é frequentemente diagnosticada em crianças com idades inferiores a quatro anos, enquanto *L. donovani* pode infetar indivíduos de qualquer idade, mas sobretudo jovens adultos (Beaver et al, 1984).

Trata-se de uma infecção sistemática, na qual o parasita invade as células do sistema fagocitário mononuclear, especialmente os órgãos vitais como o baço, fígado, medula óssea e gânglios linfáticos. Os sintomas variam entre os indivíduos infetados, que poderão apresentar desde febre intermitente, dor abdominal, diarreia, anemia, caquexia, pancitopenia, hiperproteinemia a hepatoesplenomegalia (Figura 2) (Chappuis et al, 2007). A evolução da doença é progressiva, podendo ser fatal se não for tratada. Os

indivíduos que sobrevivem adquirem imunidade, que pode ser transitória (Bogitsh e Cheng, 1998).



Figura 2 – Caso típico de Leishmaniose visceral com malnutrição e hepatoesplenomegalia (Fonte: OWH, 2012).

Nas últimas décadas, tem-se observado um crescente aumento do número de casos de leishmaniose diagnosticados em indivíduos imunodeprimidos co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (Campino et al, 1997). Neste caso são frequentes as manifestações clínicas atípicas, ocorrendo envolvimento de tecidos e órgãos que não são usualmente atingidos, tal como a pele.

2.1.2. Leishmaniose cutânea

É mais amplamente distribuída, com cerca de um terço dos casos ocorrendo em três principais regiões: América, Bacia Mediterrânea e Ásia Ocidental (Figura 3). Os 10 principais países com a maior estimativa de casos, Afeganistão, Algeria, Colombia, Brasil, Irão, Síria, Etiópia, Norte do Sudão, Costa Rica e Perú, juntos contam com mais de 70 a 75% da incidência global de LC. A incidência anual de novos casos estima-se ser entre os 0,7 e 1,2 milhões (Alvar et al, 2012).

No Velho Mundo, *L. major* é o principal agente etiológico responsável por LC no norte de África, Oriente Médio, Península Arábica, Quênia, Sudão e Índia. Apresenta uma transmissão zoonótica, principalmente através de hospedeiros roedores. *L. tropica* é também um agente de LC, fundamentalmente em áreas urbanas e está essencialmente restringida a humanos. Encontra-se na Grécia, Sérvia, Roménia, Turquia, Afeganistão, Norte de África, Médio Oriente e algumas regiões da Ásia Ocidental. *L. aethiopica* pode ser encontrada na Etiópia, Quênia, e Uganda. Esta espécie causa LC difusa e os principais reservatórios incluem gado e roedores.

Apesar de ser mais frequentemente associada a LV, no início do século XXI, *L. infantum* foi identificada como agente causador de LC no Sudoeste da Europa (Campino e Abranches, 2001). No Norte de África, onde *L. major* e *L. tropica* são responsáveis por LC, também alguns isolados de lesões cutâneas foram igualmente identificados como *L. infantum* (Gramiccia et al, 1991). A LC é maioritariamente causada pelos zimodemes MON-11, MON-29, MON-33, MON-78 e MON-111 (Gramiccia et al, 1992).

No Novo Mundo a LC pode ser causada por *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. naiffi* e *L. lainsoni*. *L. mexicana* encontra-se desde o Sul dos Estados Unidos à Colômbia, enquanto *L. amazonensis* está mais restrita à América do Sul. *L. braziliensis* é o principal agente causador de LMC na América Central e na América do Sul. Na mesma região, são também responsáveis pela forma cutânea, as espécies *L. peruviana*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. naiffi* e *L. Lainsoni*. As espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, na sua generalidade, são transmitidas por flebótomos do género *Lutzomyia* e possuem como reservatórios principais, uma grande variedade de animais domésticos e selvagens (Dedet e Pratlong, 2003; Grimaldi e Tesh, 1993).

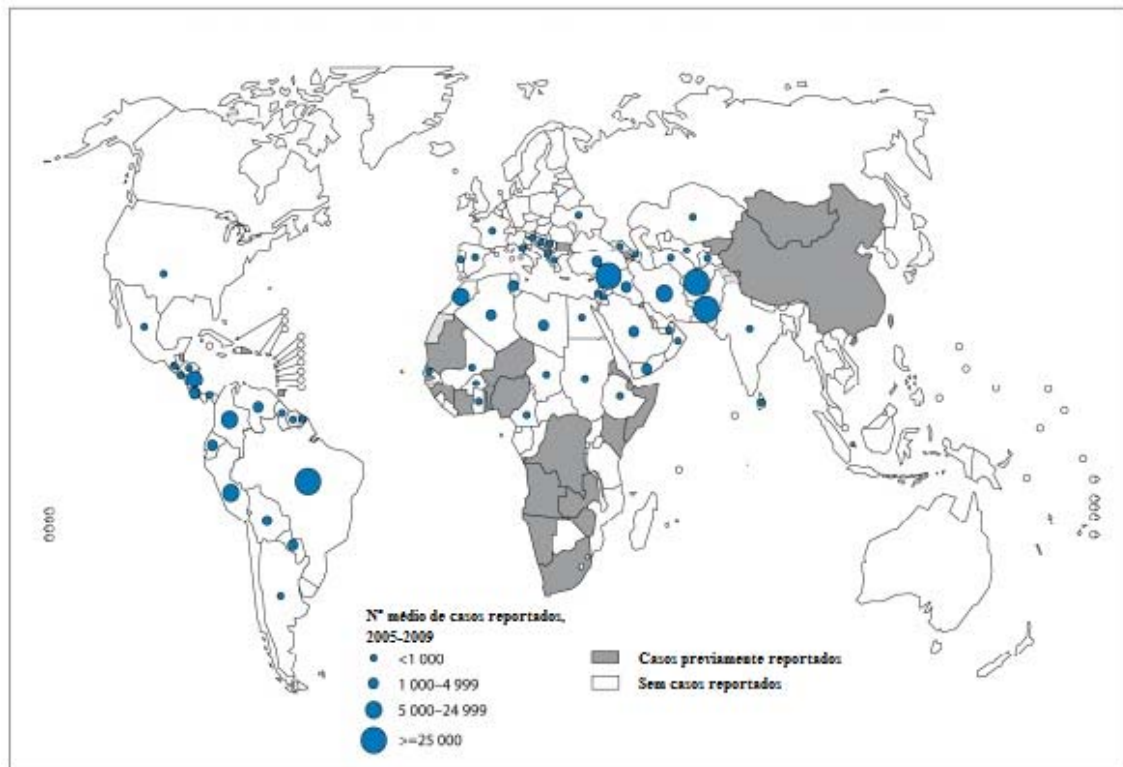


Figura 3 – Distribuição geográfica de Leishmaniose cutânea no Velho e Novo Mundos (Adaptado de: WHO, 2010c).

A LC na maioria dos casos tem cura espontânea, sem intervenção externa, embora a gravidade da doença e evolução no tempo para a cura possam variar, dependendo da espécie do parasita infetante e da natureza da resposta imunológica do indivíduo infetado (Farrell, 2002).

A LC apresenta-se sob duas formas principais: leishmaniose cutânea localizada (LCL) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Figuras 4 A e B). As lesões ocorrem nas partes expostas da superfície do corpo acessível aos flebótomos, principalmente na face, mãos, antebraços e membros inferiores. A LCL apresenta-se como lesões de pele, geralmente num nódulo local, que úlcera e cura espontaneamente, sem o envolvimento de mucosas e infeções generalizadas. Em situações de epidemia, a doença tende a ser mais grave, com lesões múltiplas que podem provocar cicatrizes desfigurantes e despigmentação da pele (Dedet e Pratlong, 2003). A LCD é uma forma rara e de cura difícil. É caracterizada por uma não ulceração das lesões iniciais, mas após um período de tempo (meses a anos), dissemina-se através da corrente sanguínea para outros locais da pele, produzindo

nódulos isolados. Esta forma da doença progride ao longo de muitos anos sendo rara a cura espontânea.

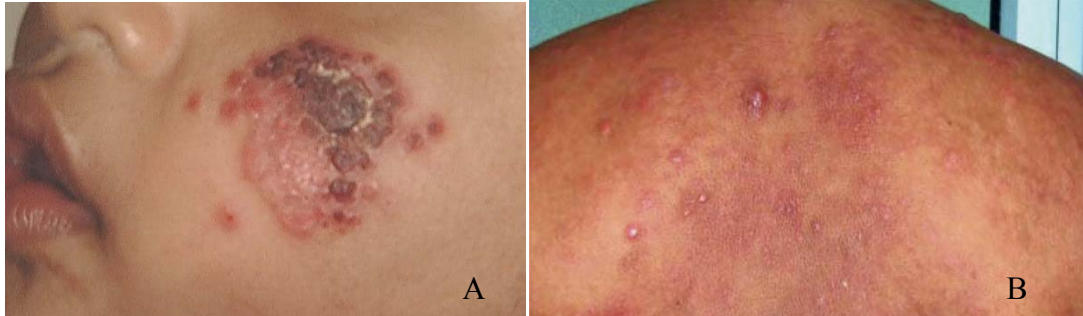


Figura 4 – A) Caso típico de Leishmaniose cutânea localizada (Fonte: Dermaamin, n.d.), B) Caso típico de Leishmaniose cutânea difusa (Fonte: Calvopina et al, 2006).

2.1.3. Leishmaniose mucocutânea

A LMC, também designada de Espúndia, encontra-se na América Central e Sul, sendo uma forma de LC mais agressiva, causada pelos parasitas das espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e, ocasionalmente, por *L. panamensis* e *L. peruviana*. É uma zoonose selvagem, característica do Novo Mundo, cujos reservatórios naturais são pequenos roedores silváticos, preguiças e cavalos.

Esta forma de leishmaniose desenvolve-se em duas fases: uma lesão cutânea primária, semelhante à LC, eventualmente seguida, após um período variável de latência, pelo envolvimento das mucosas secundárias (Figura 5) (Dedet e Pratlong, 2003).



Figura 5 – Caso típico de Leishmaniose mucocutânea (Fonte: Shahane, n.d.).

A LMC e as formas mais graves de LC constituem uma epidemia com um impacto sócio-económico negativo em populações sub-desenvolvidas, causando graves sequelas físicas e psicológicas resultando na maioria das vezes no afastamento da sociedade por parte dos indivíduos infetados.

2.2. Leishmaniose em Portugal

Em Portugal, o primeiro caso de leishmaniose foi descrito por Dionysio Alvares em 1910, numa criança do sexo feminino, de 9 anos de idade, residente em Lisboa (Alvares, 1910), sendo este país, um dos primeiros na Europa, a identificar a doença (Campino et al, 2012). No ano seguinte, Alvares & Silva demonstraram uma prevalência de 2,66% de Lcan na região de Lisboa (Alvares e Silva, 1911). A partir desta data, sucederam-se diversas descrições de casos de LV e Lcan (revisto por: Campino et al, 2012; Campino e Maia, 2010; Abranches e Pires, 1980).

Na década de 50, observou-se um aumento acentuado da incidência de LV por todo o país, com destaque na região de Trás-os-Montes e Alto-Douro, tendo a doença passado a ser de declaração obrigatória (Azevedo, 1960; Ramos e Farinhote, 1952).

A partir da década de 70, os trabalhos de Carlos Pires, Pedro Abranches e outros investigadores do IHMT vieram esclarecer o conhecimento sobre a distribuição, quer do vetor e do agente etiológico, quer da prevalência da doença em diversas regiões do país (revisto por: Campino et al, 2012; Pires, 2000; Abranches et al, 1993).

Até ao final da década de 90, apesar de se encontrarem casos esporádicos de LV e Lcan por todo o país, foram identificados três principais focos endémicos: Região do Alto Douro, Região Metropolitana de Lisboa e a Região do Algarve (Campino e Maia, 2010).

Neste país, a leishmaniose tem como agente etiológico *L. infantum* MON-1, cujo reservatório principal é o cão, tendo vindo a ser considerada uma doença predominantemente infantil (Campino et al, 2006). Contudo, nas últimas décadas, verificou-se uma tendência para a diminuição do número de casos em crianças e o aumento da infeção em adultos, principalmente associada a casos de VIH (Campino e Maia, 2012; Campino, 1998). Em 1994, tendo em conta o elevado número de casos em doentes com sida pertencentes ao grupo de risco de uso de drogas de administração endovenosa, levantou-se a hipótese, posteriormente confirmada, que a transmissão do parasita através da partilha de seringas e agulhas contaminadas seria possível (Campino et al, 1994).

Desde o início de 2000 até ao final de 2012 foram diagnosticados laboratorialmente, na Unidade de leishmanioses do IHMT, 212 novos casos de LV, 82 dos quais em indivíduos imunocompetentes (57 crianças e 25 adultos) e 130 em indivíduos imunodeprimidos (1 criança e 129 adultos) (Campino L., comunicação pessoal). Entre 1999 e 2009, foram notificados na Direção Geral de Saúde (DGS), 152 casos de LV, dos quais 74 pertenciam à Região Metropolitana de Lisboa, não existindo novos dados desde então (Serrada, 2010). Estes números provam a subnotificação da doença por parte dos estabelecimentos de saúde, já que, apesar de a LV ser de declaração obrigatória desde os anos 50, os números oficiais dos últimos anos apenas abrangem cerca de uma dezena de casos por ano em todo o País.

O número de casos de Lcan tem vindo a aumentar em Portugal, estando esta zoonose incluída, desde 2002, no grupo das infeções de notificação obrigatória durante as campanhas de vacinação anti-rábica (Campino e Maia, 2010). Pela primeira vez neste país, efetuou-se um rastreio de Lcan a nível nacional, tendo-se obtido uma

seroprevalência global de 6,31%, com áreas onde se atingiu até 17,40% (Cortes et al, 2012a).

Apesar da LC ser considerada rara neste País, atualmente, estima-se que sejam diagnosticados cerca de 10 novos casos por ano (Campino et al, 2012). Uma vez que é frequente a cura espontânea nos casos de LC, provavelmente a maior parte dos casos não são diagnosticados. Também nestes casos, o agente etiológico que tem sido identificado é *L. infantum*, a mesma espécie responsável por LV, sendo também conhecida como causadora de LC noutros países da Europa.

3. Parasita

3.1. Morfologia

Os parasitas do género *Leishmania* são protozoários dimórficos que apresentam no seu ciclo de vida duas formas morfológicas: a forma amastigota intracelular (Figura 6), no sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro mamífero, e a forma promastigota flagelada (Figura 7), no trato intestinal do inseto vetor.

A forma amastigota imóvel, apresenta um corpo redondo ou oval, um diâmetro de 2-6 µm, contendo um núcleo, um organelo designado cinetoplasto, que contém grande quantidade de DNA, e que prolonga a única mitocôndria celular e um flagelo interno. Os amastigotas multiplicam-se por divisão binária dentro dos vacúolos de macrófagos do hospedeiro vertebrado.

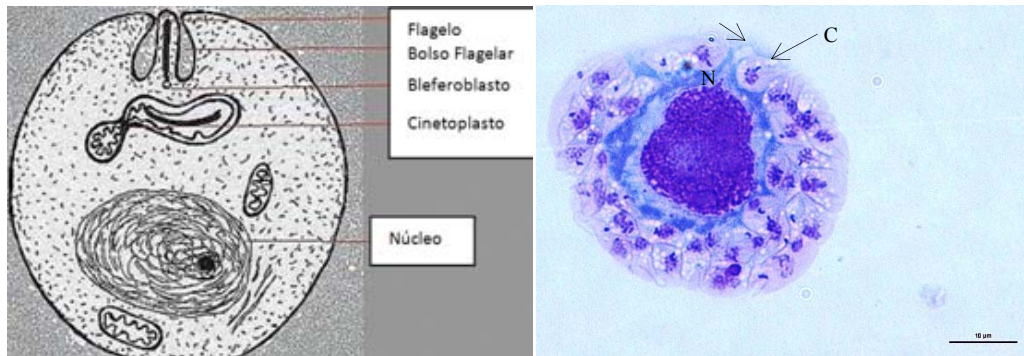


Figura 6 – Formas amastigotas de *Leishmania*.

A) Representação esquemática (Adaptado de: Violi, 2010); B) Macrófago com amastigotas intracelulares, A= 1000x, Foto: G. Manjate); C, Cinetoplasto; N, Núcleo.

A forma promastigota, móvel, apresenta um corpo longo (cerca de 10-20 µm por 2.5-5 µm), com um núcleo, um cinetoplasto e um longo flagelo livre.

No decorrer do processo de desenvolvimento, o parasita na forma promastigota multiplica-se extracelularmente passando por diferentes formas morfológicas, entre as quais: os promastigotas procíclicos, com formas elipsóides, com um flagelo de tamanho aproximado ao do corpo celular, e os promastigotas metacíclicos, de corpo mais estreito e curto, com um longo flagelo, cerca de duas vezes mais comprido que o corpo celular e que lhe confere maior mobilidade (Bates, 1994). Esta forma constitui a fase final do desenvolvimento sequencial do promastigota no intestino do vetor e é aquela que é inoculada no hospedeiro vertebrado.

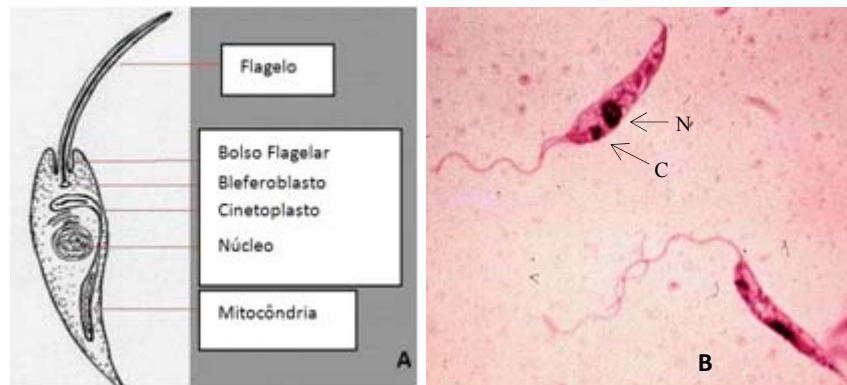


Figura 7 – Formas promastigotas de *Leishmania*.

A) Representação esquemática (Adaptado de: Violi, 2010); B) Promastigotas, A= 1000x, (Adaptado de: TriTryp Portal, n.d.); C, Cinetoplasto; N, Núcleo.

3.2. Ciclo de vida

O ciclo de vida do parasita no vetor é um processo complexo que envolve alterações comportamentais, morfológicas e bioquímicas e é semelhante para todas as espécies de *Leishmania*.

No ciclo de vida de *Leishmania*, a infecção resulta da transmissão do parasita ao hospedeiro vertebrado pela picada de insetos hematófagos infetados (Figura 8). Quando um inseto vetor fêmea faz a sua refeição de sangue num mamífero infetado com *Leishmania*, os amastigotas intracelulares são ingeridos pelo inseto. Os parasitas ingeridos passam diretamente para o intestino médio do vetor onde são envolvidos pela membrana peritrófica. Esta membrana encontra-se completamente formada 24 horas após a ingestão do sangue e, em resposta ao estímulo sanguíneo, protegendo o epitélio do intestino do conteúdo da refeição sanguínea (Blackburn et al, 1988). Com o progredir da digestão, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas e a membrana peritrófica começa a desintegrar-se, libertando os promastigotas para o intestino posterior, no caso dos flebótomos vetores do sub-género *Viannia*, ou para o intestino médio, no caso dos flebótomos vetores do sub-género *Leishmania*.

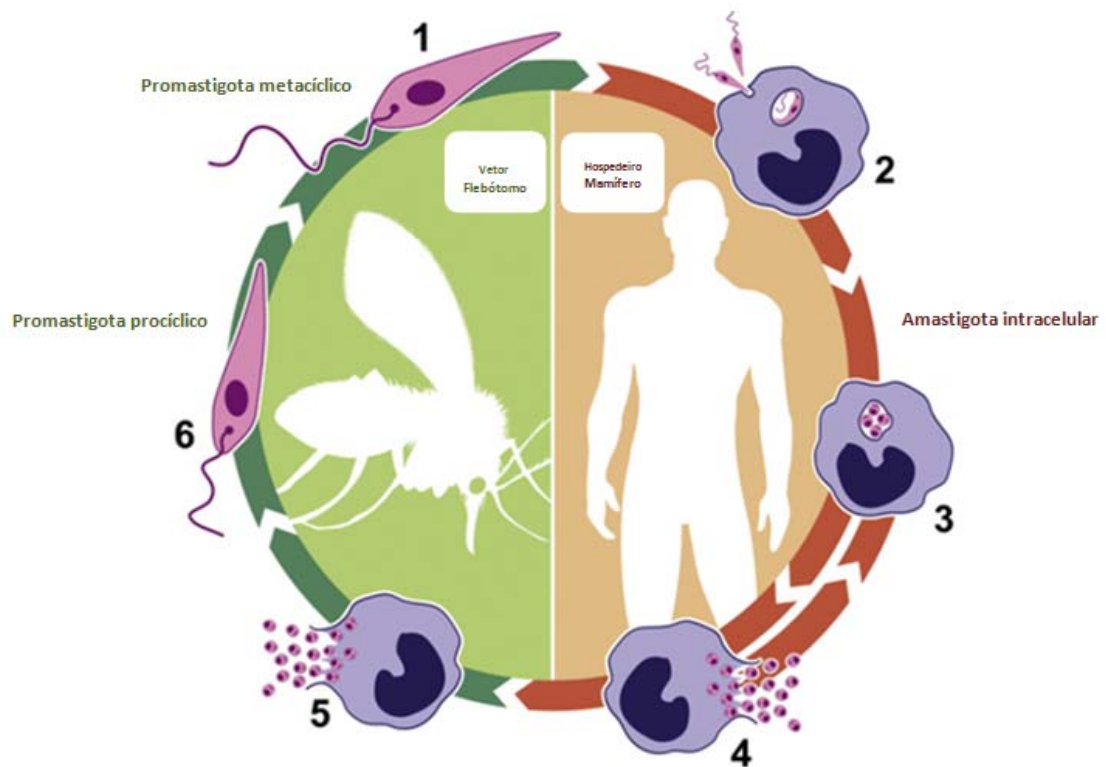


Figura 8 – Ciclo de vida de *Leishmania*. 1) Promastigotas metacíclicos transmitidos durante a refeição sanguínea do flebótomo, 2) Promastigotas metacíclicos fagocitados por macrófagos, 3) Transformação dos promastigotas em amastigotas nos fagolisossomas, 4) Proliferação da infecção para outras células mononucleares fagocíticas, 5) Flebótomo ingere macrófagos infectados, 6) Amastigotas transformam-se em promastigotas (Adaptado de: Cuervo et al, 2010).

Os promastigotas livres multiplicam-se intensamente no interior do trato intestinal dos flebótomos, passando sucessivamente por várias modificações na sua forma. Após 4 a 5 dias da ingestão da refeição sanguínea, estas formas diferenciam-se em promastigotas metacíclicos, o estado infetante para o hospedeiro vertebrado. Cerca de 9 dias depois estes migram para a zona proximal do tubo digestivo (válvula estomodeal), prontos a serem inoculados no hospedeiro vertebrado durante a próxima refeição sanguínea, na qual, juntamente com a saliva do vetor promovem a sua fagocitose pelos macrófagos (Lambson et al, 2002; Sacks e Perkins, 1984). As formas promastigotas, após a fagocitose conseguem sobreviver, apesar da exposição a oxidantes altamente tóxicos, como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e superóxido ($\cdot O_2^-$) originados da fagocitose. (Wilson et al, 1994).

Quando o desenvolvimento intracelular dos amastigotas permanece localizado no sítio de inoculação (tecido subcutâneo), várias citocinas são libertadas induzindo reações celulares que resultam no desenvolvimento de uma lesão localizada de LC. Noutros casos, os parasitas disseminam-se para os órgãos do sistema mononuclear fagocitário, dando origem a LV (Dedet e Pratlong, 2003).

Se a infeção for bem sucedida, o ciclo completa-se quando o vetor faz uma nova refeição sanguínea, ingerindo macrófagos infectados (Bogitsh e Cheng, 1998).

3.3. Genoma

Os parasitas de *Leishmania* exibem características únicas na sua biologia. O conhecimento acerca da sua biologia molecular constitui a base para a compreensão das alterações morfológicas e bioquímicas de *Leishmania* e evasão ao sistema imune (Stiles et al, 1999).

O parasita *Leishmania* possui dois genomas, um representado pelo DNA nuclear, o qual difere do DNA de outros eucariotas, e o outro pelo DNA cinetoplastideal (kDNA) que se encontra no cinetoplasto. O DNA nuclear contém aproximadamente 35 megabases (Mb) e o cariótipo está organizado em 34 a 36 cromossomas, dependendo da espécie. À exceção de alguns cromossomas, que se apresentam aneuploides, a diploidia em *Leishmania* está atualmente aceite (Bañuls et al, 2007). Apesar deste parasita possuir uma reprodução essencialmente clonal, alguns autores têm vindo a descrever a existência de recombinação génica (Tibayrenc e Ayala, 1999).

O cinetoplasto é um organelo que contém uma importante quantidade de DNA. Consiste num disco microscopicamente visível, com 1 a 2 µm de diâmetro, contendo aproximadamente 10 Mb de DNA semelhante ao DNA mitocondrial, representando 10 a 20% do DNA total (Simpson et al, 1987). O kDNA é constituído por 50 a 100 maxicírculos que possuem genes codificantes de proteínas mitocondriais e RNA ribossomal (rRNA), e cerca de 10 000 a 20 000 minicírculos com sequências que variam de 500 pb a 2500 pb (Yurchenko et al, 1999).

3.4. Híbridos de *Leishmania* spp.

Os tripanossomatídeos que causam doenças humanas (*Trypanosoma* e *Leishmania*), foram durante muitos anos, considerados estritamente clonais, ou seja, incapazes de trocas genéticas, com reprodução confinada a divisão binária (Nolder et al, 2007). A sequenciação de um determinado número de genes, demonstrou que estirpes de *T. cruzi*, apresentavam genótipos recombinantes e eram o produto de um ou mais eventos de hibridação entre as estirpes naturais desta espécie (Miles et al, 2009). Gaunt et al (2003) demonstraram a ocorrência de recombinação genética em *T. cruzi*, após o cruzamento de estirpes transgênicas resistentes a diferentes fármacos e o isolamento de estirpes híbridas duplamente resistentes. Também Gibson et al (2008) usaram parasitas *T. brucei* transgênicos, para detetar híbridos, demonstrando que a recombinação genética ocorria nas glândulas salivares do vetor.

Nos últimos anos, em diferentes regiões endêmicas, identificaram-se estirpes híbridas naturais, ocorrendo essencialmente entre espécies geneticamente próximas. No Novo Mundo, foi descrita a presença de híbridos de *L. braziliensis*/*L. panamensis* na Nicarágua (Belli et al, 1994), de *L. braziliensis*/*L. guyanensis* na Venezuela (Delgado et al, 1997) e Equador (Bañuls et al, 1999) e de *L. braziliensis* /*L. peruviana* no Perú (Dujardin, 1995). No Velho Mundo, têm sido observados híbridos de *L. major*/*L. arabica* (Kelly et al, 1991), e *L. infantum*/*L. donovani* (Hide e Bañuls, 2006). Ainda no Velho Mundo, foi descrita a existência de estirpes híbridas entre duas espécies filogenética e epidemiologicamente distantes, *L. infantum*/*L. major* em Portugal (Ravel et al, 2006) e híbridos de *L. donovani*/*L. major* no Sudão (Hamad et al, 2011).

Estas estirpes híbridas portuguesas, foram já estudados relativamente ao seu potencial de transmissão, tendo sido demonstrado que estes híbridos produziam LPG de *L. major*, permitindo a sua sobrevivência em *P. papatasi*, vetor este apenas permissivo para *L. major* e não *L. infantum* (Volf et al, 2007). No entanto, alguns autores debatem a existência destas estirpes híbridas, num país onde, embora existam os vetores (*P. perniciosus* e *P. papatasi*) das espécies putativas parentais (respetivamente, *L. infantum* e *L. major*), apenas a espécie *L. infantum* é endémica (Campino e Maia, 2010). Já no Sudão, ambos os vetores (*P. orientalis* e *P. papatasi*) e as espécies (respetivamente, *L. donovani* e *L. major*) co-existem (Hamad et al, 2011).

Os padrões de hibridação em *Leishmania* reportados no Velho Mundo (Schwenkenbecher et al, 2006; Evans, 1987) e no Novo Mundo (Belli, 1994; Bañuls, 1993; Darce, 1991), assim como a ocorrência natural de estirpes híbridas entre diferentes espécies de *Leishmania*, veio reforçar a hipótese de existência, embora rara, de reprodução sexual nestes parasitas (Tibayrenc, 1999, 1990).

A ocorrência de troca genética em *Leishmania* foi recentemente comprovada no trato digestivo de vetores experimentalmente infectados com estirpes duas transgênicas de *L. major*, resistentes a diferentes fármacos, cuja descendência herdou marcadores genéticos e características fenotípicas de ambas as estirpes parentais (Akopyants et al, 2009).

Em condições de “stress”, a troca genética pode ser crucial para a geração de novos fenótipos, alguns com vantagens seletivas (ex.: resistência a fármacos) e subsequente expansão numa população parasitária de *Leishmania*, contribuindo para a sua diversidade fenotípica, adaptação a novos nichos ecológicos, vetores e hospedeiros, incluindo humanos e animais domésticos (Miles et al, 2009; Cortes et al, 2012).

A ocorrência, emergência e comportamento de estirpes híbridas têm vários aspetos pouco esclarecidos que poderão ser relevantes para o diagnóstico, tratamento e estratégias de controlo (Miles et al, 2009). A caracterização das propriedades fenotípicas destes híbridos de *Leishmania*, poderão ser importantes para o conhecimento da infeciosidade, patogenicidade e dinâmica de transmissão desta parasitose.

4. Hospedeiro

4.1. Vetor – Hospedeiro invertebrado

O inseto vetor envolvido na transmissão de *Leishmania*, é o díptero da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae. Os adultos são pequenos insetos de voo de curta distância, com cerca de 2-4 mm de comprimento e um corpo peludo amarelado (Farrel, 2002). Caracterizados por possuírem asas estreitas e eretas, corpo delgado, patas compridas e mandíbulas longas. Estes insetos durante o dia, descansam em lugares escuros e protegidos e são ativos no crepúsculo e durante a noite. Ambos os sexos se

alimentam de plantas, no entanto, as fêmeas precisam de uma refeição sanguínea para completarem a maturação dos ovos (Sádlová, 1999).

Os “habitats” de alimentação dependem das espécies de flebotomíneos, assim como da natureza do hospedeiro onde obtêm a sua refeição, sendo portanto, um ponto-chave para a transmissão de *Leishmania*.

Cerca de 800 espécies de flebotomíneos já foram descritas, e estão divididas em cinco gêneros: *Phlebotomus* e *Sergentomyia* no Velho Mundo e *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya* no Novo Mundo. Cerca de 70 espécies, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (Figura 9), são comprovadamente vetores de parasitas *Leishmania* patogênicos para o Homem, existindo um certo nível de especificidade entre o parasita e as espécies flebotomínicas (Farrel, 2002).

A eficiência da transmissão do parasita pelo vetor apresenta grande variabilidade, dependendo da longevidade, preferências tróficas e densidade dos mesmos. Assim, as populações vetoriais que vivam perto de bons reservatórios terão presumivelmente uma maior capacidade de transmissão (Dedet e Pratlong, 2003).

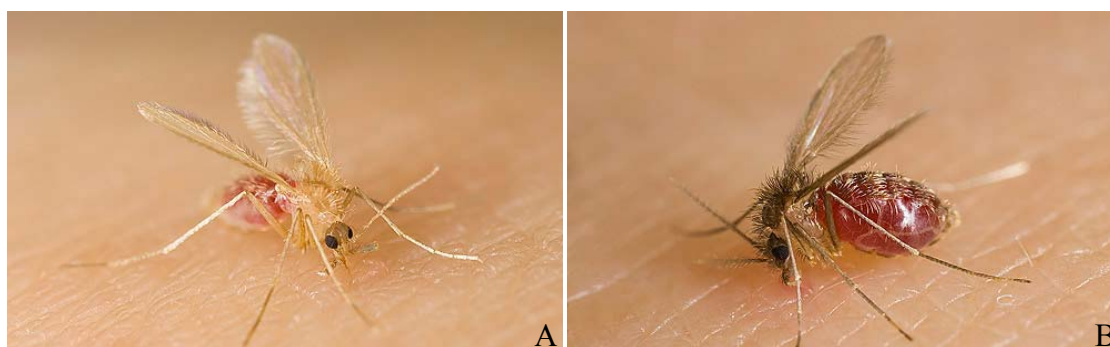


Figura 9 – Fêmeas flebotomíneas após refeição sanguínea.

A) *Phlebotomus papatasi* e B) *Lutzomyia longipalpis* (Adaptado de: Wilson, n.d.).

4.2. Reservatório – Hospedeiro vertebrado

Um reservatório é um animal que serve como fonte de infecção humana. De acordo com Bray (1982), um reservatório habitual deve estar em contato próximo com o humano, deve ser suscetível ao agente patogênico e deve estar disponível para o vetor de forma a causar infecção. A doença deverá permitir a sobrevivência do animal pelo menos até à

temporada de transmissão seguinte. Dependendo do foco, o reservatório pode ser um mamífero selvagem, doméstico, ou mesmo o ser Humano, no caso da antroponose.

O reservatório accidental, é aquele, no qual a infecção ocorre em situações raras, não permitindo a continuação do ciclo. No entanto, este tipo de reservatórios poderão contribuir para a introdução ou reintrodução da infecção numa determinada região. O cavalo (Rolão et al, 2005), a vaca (Alam et al, 2011), a cabra (Bhattarai et al, 2010), a lebre (Ruiz-Fons et al, 2013), o gato (Poli et al, 2002), entre outros, têm sido referidos como hospedeiros accidentais. Na última década, tem sido colocada a hipótese do gato poder desempenhar um papel de reservatório habitual em vez de accidental (Maia e Campino, 2011; Maia et al, 2010).

Na Bacia mediterrânica, Ásia e América Latina, o cão é o principal reservatório da infecção por *L. infantum*. Contudo, ao contrário da maioria dos reservatórios, este desenvolve uma doença fatal generalizada (Figura 10) (Farrel, 2002). A Lcan é um grave problema veterinário e de saúde pública. No sudoeste da Europa, a doença atinge cerca de 2.5 milhões de cães (revisto por Cortes et al, 2012a). Mesmo os cães assintomáticos, constituem um bom reservatório, representando um risco de transmissão da doença (Campino e Maia, 2012).

Os sinais clínicos de Lcan variam com a diversidade de mecanismos patogénicos, da progressão da doença e das diferentes respostas imunitárias do animal. A infecção pode causar nos cães uma doença crónica com envolvimento viscerocutâneo, que pode atingir todos os órgãos. Os cães infetados podem apresentar um ou mais dos seguintes sinais clínicos: linfadenomegalia, alterações cutâneas, perda de peso, epistaxis, conjuntivite, onicogrifose, caquexia e alterações de locomoção (Campino e Maia, 2012; Cardoso, 1998)



Figura 10 – Sinais clínicos de leishmaniose canina (Fonte: Onleish, n.d.).

5. Interação parasita-hospedeiro

A invasão do hospedeiro vertebrado por *Leishmania* é um processo complexo determinado pela interação de vários fatores relacionados com o hospedeiro e com o parasita. Um desses fatores está relacionado com a virulência do parasita. Define-se virulência, como o grau de patogenicidade de um microrganismo, manifestado contra o hospedeiro com um sistema imunitário intacto, em condições normais (Chang et al, 2003). Desta forma, as manifestações clínicas da doença resultam, quer dos determinantes invasivos do parasita (ex.: glicoproteína de 63 kDa - gp63 - e o lipofosfoglicano - LPG), quer dos determinantes imunitários do hospedeiro (Chang, 2003). A evolução da infecção depende da capacidade do hospedeiro reagir a esses determinantes (Sádlová, 1999).

Sendo intracelular obrigatório, o primeiro alvo do parasita *Leishmania* é o macrófago. Apesar de estas células serem especializadas na fagocitose e destruição de agentes patogénicos, os parasitas *Leishmania* possuem características específicas que lhes permitem resistir perante o sistema de defesa imunológico do hospedeiro. O estabelecimento do parasita processa-se em 3 etapas: (1) reconhecimento e entrada no macrófago, (2) sobrevivência e multiplicação dentro do macrófago e (3) modulação da resposta imune mediada por linfócitos T (Bogdan, 1990).

As formas promastigotas procíclicas (não infecciosas), ativam o complemento e são rapidamente lisadas. Contudo, as formas promastigotas metacíclicas (infecciosas) desenvolvem mecanismos que lhes permitem não só bloquear a atividade lítica do

complemento, como ainda explorar a capacidade de opsonização e quimiotaxia do mesmo (Zambrano-Villa et al, 2002).

Das moléculas parasitárias identificadas como responsáveis pela virulência em *Leishmania*, a gp63 e o LPG, são consideradas as mais importantes. Localizam-se na membrana plasmática e estão envolvidas na ativação da fração C3 do complemento, atuando na fase crucial da interação parasita-hospedeiro, estimulando a ligação ao macrófago e a sua proteção dentro dos fagolisossomas, influenciando ainda a migração dos monócitos (Sádlová, 1999).

Durante a fagocitose, os lisossomas que contêm hidrolases, fundem-se com o fagossoma, que contém o parasita (vacúolo parasitóforo), formando o fagolisossoma. Desjardins e Descoteaux (1997) demonstraram que os promastigotas podem inibir a fusão fagossoma-lisossoma, por ação de LPG. A passagem da forma promastigota para a forma amastigota é acompanhada por uma diminuição de LPG, restabelecendo-se a fusão fagossoma-lisossoma, pelo que as formas amastigotas têm que resistir ao meio ácido e rico em proteases do vacúolo parasitóforo. Um desses mecanismos é a indução de alterações na homeostasia do macrófago. Os parasitas promovem o aumento da concentração de Ca^{2+} dentro do macrófago, alterando assim as suas vias de sinalização dependentes de Ca^{2+} . Como consequência, os macrófagos ficam com os mecanismos de resposta a estímulos internos alterados, afetando as funções de combate ao parasita, como o choque oxidativo, entre outros (Dumas et al, 1997). Por outro lado, as formas promastigotas metacíclicas não estimulam o choque oxidativo, devido a dois principais fatores: (1) utilizam um recetor específico para internalização no macrófago (2) utilizam LPG na inibição da proteína Cinase C do macrófago, a qual é essencial para a produção de metabolitos oxidativos (McNeely e Turco, 1990).

Outros fatores, não relacionados com o parasita ou com o reservatório também intervêm no estabelecimento da infeção. É o caso da saliva do vetor que parece desempenhar um papel relevante na capacidade infecciosa do parasita, uma vez que contém substâncias ativas que aumentam a infeciosidade das formas promastigotas de *Leishmania* (Titus e Ribeiro, 1988). Estas substâncias interferem ao nível da imunidade, facilitando o estabelecimento da infeção no hospedeiro.

6. Métodos de diagnóstico laboratorial

Apesar do progresso observado no desenvolvimento de diversos métodos de diagnóstico diretos e indiretos, o diagnóstico laboratorial de leishmaniose ainda permanece um desafio. Um teste de diagnóstico eficiente, além de ter que ser capaz de confirmar uma suspeita clínica em indivíduos sintomáticos ou mesmo em indivíduos assintomáticos, deve ter alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Deve ser simples, fácil de executar, pouco dispendioso, praticável em laboratórios com poucos recursos ou adaptável em condições de campo. Idealmente, deverá detetar todos os indivíduos infectados por *Leishmania*, preferencialmente usando técnicas não invasivas para a recolha de amostras biológicas (Maia e Campino, 2008).

Podem-se considerar dois tipos de diagnóstico laboratorial: o diagnóstico direto, no qual se destacam os métodos parasitológicos (deteção do parasita) e os métodos moleculares para deteção do DNA parasitário e, o diagnóstico indireto, que corresponde aos métodos seroimunológicos (deteção de anticorpos anti-*Leishmania*) (Maia et al, 2009).

6.1. Diagnóstico direto

6.1.1. Métodos parasitológicos

Exame direto

O exame direto, consiste na visualização de amastigotas de *Leishmania* em esfregaços fixados e corados de tecidos/orgãos infectados, como medula óssea, gânglios linfáticos, pele ou sangue periférico (Maia e Campino, 2008). A maior parte das amostras biológicas são obtidas de forma invasiva e geralmente não providenciam uma boa deteção do parasita em indivíduos assintomáticos. O exame direto apresenta algumas vantagens: a fácil manipulação e conservação do material biológico e o rápido resultado. Por outro lado, apresenta como principal desvantagem a baixa sensibilidade (Alvar et al, 2004).

Exame cultural

O exame cultural utiliza o meio bifásico “Novy-MacNeal-Nicolle” (NNN) com soro fisiológico. Uma vez que nem todas as estirpes de *Leishmania* crescem à mesma velocidade e nem todos os tecidos/orgãos têm a mesma carga parasitária, a cultura pode aumentar a sensibilidade da detecção do parasita (Evans, 1989). Apesar da elevada especificidade (100%), é um método moroso, que perde sensibilidade principalmente em estados iniciais da doença (carga parasitária baixa) ou quando a cultura é contaminada por outros microorganismos. Por outro lado, este é um dos métodos de eleição para isolamento e posterior crescimento em massa de culturas de parasitas para identificação isoenzimática, produção de antígeno para ensaios imunológicos, infecções experimentais ou ensaios “in vitro” para triagem de fármacos ou até identificação molecular (Campino e Maia, 2008).

6.1.2. Métodos moleculares

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta muito utilizada para a detecção de DNA parasitário. A sua sensibilidade aumentou com a utilização de sequências iniciadoras (“primers”), baseadas em sequências com mais do que uma cópia por célula. No caso de *Leishmania*, essas sequências incluem, entre outras, os minicírculos de DNA do cinetoplasto (kDNA) (Smyth, 1992) e a sequência de SSU rRNA ou 16S rRNA (van Eys et al, 1992).

Os métodos baseados em PCR, aplicados para a detecção de *Leishmania*, são mais fidedignos, não só para a determinação da presença e identificação do DNA do parasita em potenciais casos ativos, mas também para a monitorização da cura parasitológica após quimioterapia (Maia e Campino, 2008).

A PCR pode ser aplicada para a detecção de DNA do parasita, com elevadas especificidades e sensibilidades, numa grande variedade de amostras como sangue periférico, soro, medula óssea, gânglio linfático, pele ou até conjuntivas (Ferreira et al, 2008; Maia et al, 2006; Strauss-Ayali et al, 2004; Andrade et al, 2002; Fisa et al, 2001).

6.2. Diagnóstico indireto

O diagnóstico baseado em métodos serológicos é frequentemente utilizado. Estes métodos baseiam-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. Apesar de constituírem uma ferramenta essencial no diagnóstico desta parasitose, a presença de anticorpos só por si, não constitui um sinal conclusivo da doença (Campino, 2002; Deplazes et al, 1995; Harith et al, 1989).

Destacam-se, entre os testes serológicos mais utilizados, o teste de imunofluorescência indireta (IFI), o teste de aglutinação direta (DAT), o “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) e a contraímunoeletroforese (CIE), cujas sensibilidades variam entre 21.6% e 100% e a especificidade entre 84.9% e 100%, dependendo da origem da amostra e da técnica (Maia e Campino, 2008).

7. Estudos “in vitro”

Os parasitas de *Leishmania* na forma promastigota, passam por diversas alterações morfológicas e bioquímicas, enquanto progridem da fase logarítmica para a fase estacionária em meio de cultura axénica, correspondente ao estadio após a refeição sanguínea do vetor e na altura da refeição sanguínea seguinte (Killick-Kendrick, 1979).

Os parasitas de *Leishmania* conseguem adaptar-se a ambientes diversos e heterogêneos durante o seu ciclo de vida como *i*) a temperatura – dos 37°C no hospedeiro mamífero à temperatura no inseto flebotomíneo (24-26°C), *ii*) o pH – de neutro a muito ácido no estômago do inseto flebotomíneo e no fagolisossoma do macrófago, *iii*) a concentração de oxigénio e nutrientes e *iv*) o ataque imunológico pelo complemento, anticorpos e linfócitos T (Victoir e Dujardin, 2002; Miller et al, 2000; Howard et al, 1987). Assim, torna-se essencial a existência de mecanismos eficientes para a sobrevivência do parasita a curto e longo prazo.

Embora possam existir diferenças entre as características fenotípicas no modelo parasitário “in vitro” e “in vivo”, os estudos “in vitro” permitem a análise de parâmetros biológicos básicos e da capacidade de invasão/evasão do parasita e da resposta das células hospedeiras à infeção.

8. Terapêutica em Leishmaniose

Antimoniais

Os antimoniais pentavalentes orgânicos de estibogluconato de sódio (Pentostam®) e antimoniato de meglumina (Glucantime®) são os fármacos de primeira linha mais usados desde os anos 40 no tratamento das leishmanioses em todo o mundo (Cook, 1993; Berman, 1988). A distribuição e utilização destes fármacos pelo mundo, depende essencialmente de influências ex-coloniais. Enquanto o antimoniato de meglumina se encontra distribuído nos países de língua oficial Francesa e Espanhola, o estibogluconato de sódio encontra-se essencialmente distribuído nos países de língua oficial Inglesa (Balaña-Fouce et al, 1998).

Apesar da utilização destes fármacos desde o século passado, o mecanismo de ação é ainda pouco conhecido. Sabe-se que os antimoniais pentavalentes [Sb (V)] necessitam de redução biológica para a forma trivalente [Sb (III)] para uma ação leishmanicida. No entanto, o local (amastigota ou macrófago) e o mecanismo de redução (enzimático ou não enzimático) permanece controverso (Croft et al, 2006). Alguns estudos sugerem que o estibogluconato de sódio [Sb(V)] inibe a biossíntese de macromoléculas em amastigotas (Berman et al, 1985), possivelmente por perturbação da energia metabólica devido à inibição da glicólise e da β -oxidação de ácidos gordos (Berman et al, 1987). Contudo, os alvos específicos destas vias ainda não foram identificados.

A variação na resposta clínica tem constituído um grave problema nos últimos 60 anos. Uma possível explicação para este fenómeno é a diferença da sensibilidade ao fármaco entre diferentes espécies. Por exemplo, *L. donovani* e *L. braziliensis* apresentam 3 a 5 vezes maior suscetibilidade ao estibogluconato de sódio do que *L. major*, *L. tropica* e *L. mexicana* (revisto por Croft et al, 2006).

Tal como o arsénio, os antimoniais pentavalentes, são reduzidos a formas trivalentes tóxicas, sendo estas provavelmente as responsáveis pelos efeitos secundários tóxicos no hospedeiro. Como tal, não são considerados fármacos seguros ou eficazes, estando reportados diversos casos de recidivas (revisto por Balaña-Fouce et al, 1998).

Apesar dos efeitos secundários dos antimoniais pentavalentes, a taxa de cura de leishmaniose, utilizando estes fármacos permanece em cerca de 90% de sucesso na Europa (Murray et al, 2005).

Anfotericina B

Desde os anos 60 que o tratamento de leishmaniose tem vindo cada vez mais a ser feito com o fármaco antifúngico - Anfotericina B -, tendo este vindo a ser utilizado como fármaco de primeira linha na Europa, na formulação lipídica – AmBisome® - e de segunda linha no resto do mundo, na forma de desoxicolato de Anfotericina B – Fungizone® (Croft et al, 2006).

A seletividade deste fármaco deve-se à elevada afinidade ao ergosterol, o esteroide predominante nas membranas celulares de fungos e tripanossomatídeos, e, consequentemente, presente na membrana de *Leishmania*, em contraste com o colesterol das células do hospedeiro mamífero. A diferença da sensibilidade entre espécies é expetável, devido à variação do tipo e quantidade de esteróis nas membranas das diferentes espécies (Beach et al, 1988).

Mais recentemente, houve um aumento da utilização de Anfotericina B, no tratamento de LV, quer na formulação desoxicolato quer na formulação lipídica, após a falha no tratamento de casos de coinfeção VIH/LV, com antimoniais (revisto por Croft et al, 2006).

Apesar do elevado custo deste fármaco e da sua limitação na distribuição nos países em desenvolvimento, a elevada eficácia das formulações lipídicas no tratamento de casos de LV, comprovada por diversos autores, justifica a sua utilização como primeira linha de tratamento na Europa e na Índia (Croft et al, 2006; Balaña-Fouce et al, 1998).

Diaminas aromáticas

A Pentamidina e outras diaminas aromáticas, inicialmente utilizadas para o tratamento de hipoglicemia, têm vindo a ser usadas, como fármaco de segunda linha, desde o início dos anos 40 na terapia de leishmaniose (Vörhinger et al, 1990).

O modo de ação deste fármaco é ainda controverso, contudo acredita-se estar envolvido na inibição da síntese de poliaminas e no potencial de membrana mitocondrial (Bray et al, 2003). Devido aos efeitos secundários tóxicos, a sua utilização é limitada.

Miltefosina

Este fármaco foi oficialmente reconhecido como um dos fármacos mais recorrentes no tratamento de LV (Croft e Coombs, 2003), devido à sua elevada eficácia e disponibilidade pela via oral, abrindo portas para a terapia auto-administrada pelos pacientes (Murray et al, 2005), tendo inicialmente sido desenvolvido como fármaco anticancerígeno. Os inconvenientes deste fármaco incluem o elevado custo e o potencial desenvolvimento de resistência devido à possível desistência do tratamento no período ambulatorio, pelos pacientes, sendo ainda referido por alguns autores a importância de terapia combinada (revisto por Murray et al, 2005). Presentemente é considerado o fármaco de eleição no tratamento da maioria dos casos de Lcan (Henriques J., comunicação pessoal).

Alopurinol

No início dos anos 80 este fármaco, sozinho ou em combinação terapêutica com antimoniais, entrou em ensaios clínicos para tratamento de LV e LC (Croft e Yardley, 2002). O seu mecanismo de ação em *Leishmania*, envolve a inibição de enzimas da via de resgate de purinas (Nelson et al, 1979). Pensa-se que a sua conversão em análogos de trifosfato de ribonucleósido facilite a incorporação no RNA, comprometendo a síntese de macromoléculas (Marr, 1991).

Apesar do baixo sucesso no tratamento da leishmaniose humana, este fármaco é também presentemente utilizado na quimioterapia de Lcan (Koutinas et al, 2001). As

suas propriedades farmacocinéticas, constituem a maior limitação para a utilização no tratamento de leishmaniose humana (Croft et al, 2006).

Outros fármacos

Diversos outros fármacos têm vindo a ser introduzidos sozinhos ou em combinação na quimioterapia das leishmanioses, como Paramomicina, Cetoconazol, Itraconazol, Sitamaquina, entre outros. Contudo a falta de ensaios clínicos e de conhecimentos mais específicos sobre os mecanismos de ação e resistência destes fármacos, ainda não os coloca em posição competitiva perante os demais.

Uma outra preocupação é a potencial emergência de estirpes resistentes em pacientes co-infetados com VIH. Estes pacientes têm elevadas parasitémias, fraca resposta imunitária, respondendo fracamente ao tratamento, e uma taxa de recidivas elevada, constituindo putativos reservatórios de parasitas fármaco-resistentes (revisto por Croft et al, 2006).

Diversos estudos com estes fármacos e com novas potenciais moléculas anti-*Leishmania* têm vindo a ser realizados ao longo das últimas décadas, sendo a pesquisa de novos candidatos, com alta especificidade e baixa toxicidade para o tratamento, uma das principais preocupações da OMS (WHO, 2010a).

CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS

1. Pesquisa de “novas espécies” de *Leishmania*

1.1. Amostras biológicas

No âmbito do projeto de investigação em curso, no qual se insere este trabalho de mestrado, foram coletadas amostras de medula óssea de canídeos, com colaboração do Professor Doutor Luís Cardoso da Universidade de Trás-os-Montes e Alto-Douro (UTAD), em diferentes centros da região de Trás-os-Montes e Alto-Douro. A colheita das amostras foi efetuada no período de 06 de julho de 2011 e 08 de agosto de 2013. À exceção de um animal, a colheita foi efetuada após eutanásia dos animais. Após exame físico e dependendo da presença de sinais clínicos compatíveis com leishmaniose, nos centros de recolha, os animais foram caracterizados como aparentemente saudáveis (AS - ausência de sinais clínicos) ou clinicamente suspeitos (PS - presença de sinais clínicos). Todos os procedimentos seguiram as orientações definidas pelos comités de ética da UTAD e do IHMT, bem como da legislação portuguesa (Lei nº 92/95, 12 de setembro). As amostras de medula óssea foram obtidas a partir da articulação osteocondral da sexta à nona costelas. A partir dos tubos com EDTA recebidos no IHMT, as amostras foram divididas em duas alíquotas, para diagnóstico parasitológico e para diagnóstico molecular.

1.2. Exame parasitológico cultural

Foram efetuadas culturas das amostras de sangue medular em tubos com meio de cultura bifásico (NNN), colocando cerca de 200-500 µL de amostra biológica e perfazendo 1 mL com soro fisiológico com penicilina. Os tubos inoculados foram incubados em estufa refrigerada a 24°C ±1°C (Hearaeus). Semanalmente, as culturas foram observadas entre lâmina e lamela, em microscópio ótico (Olympus CH2) para deteção do parasita. Uma vez confirmada a presença de formas promastigotas de *Leishmania*, transferiu-se uma alíquota de 500-1000 µL para meio de cultura líquido de alto rendimento Schneider (Sigma), pH 6.7, suplementado com 20% (v/v) de soro

fetal bovino (SFB, BioWhittaker) inativado 30 minutos a 56°C, e gentamicina a 50 mg/mL (Sigma). Após crescimento e estabilização das culturas de parasitas de *Leishmania* isoladas, procedeu-se à sua criopreservação.

1.3. Detecção de DNA de *Leishmania*

1.3.1. Extração de DNA

A extração do DNA das amostras clínicas de medula óssea, foi realizada com o “kit” comercial “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche) de acordo com as instruções do fabricante.

Esta técnica tem por base a ligação dos ácidos nucleicos (AN) às fibras de vidro existentes na coluna de extração, na presença de um sal caotrópico (cloridrato de guanidina). Resumidamente, os AN seletivamente ligados às fibras de vidro, sofrem uma série de passos de lavagem e centrifugação para remover contaminantes e componentes celulares. Para a remoção dos AN foi usada uma solução de baixa concentração salina, que permite a sua libertação da coluna de extração.

Após a extração procedeu-se à quantificação de DNA, de forma a controlar o rendimento das extrações, através de espectrofotómetro (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific), a um comprimento de onda de 260 nm. Para a quantificação de cada amostra utilizou-se 1 µL de DNA, registando-se a sua concentração e pureza, caracterizada pela razão entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm.

1.3.2. Controlo de extração de DNA

Para descartar a presença de fatores de inibição das reações de PCR e/ou de degradação de DNA, decidiu-se incluir um controlo para avaliar a técnica de extração de DNA. Como tal, utilizou-se como alvo, o gene constitutivo da β -actina (canina), que codifica para uma das proteínas do citoesqueleto.

A reação de amplificação efetuou-se numa solução com o volume final de 20 µL, contendo 2 µL de DNA da amostra, tampão de reação 1X (Promega), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (Bioline), 10 pmol de cada “primer”

(“forward”: 5’ TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA 3’ e “reverse” 5’ CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG 3’), 1U de *Taq* polimerase (Promega) e água ultra pura para perfazer o volume final. Em todas as amostras utilizou-se como controlo positivo 2 µL de DNA genómico obtido de baço de cão e como controlo negativo, água ultrapura em substituição do DNA. As soluções foram colocadas num termociclador PX2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation) que foi programado com as condições óptimas de amplificação (Tabela 3).

Tabela 3 – Condições de amplificação do gene da β -actina (canina).

Fases da amplificação	Temperatura (°C)	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	5 min.	1
Desnaturação	94	30 seg.	40
Ligação	64	30 seg.	
Elongação	72	30 seg.	
Elongação final	72	7 min.	1

Os produtos de amplificação, constituídos por 283 pb, foram visualizados em gel de agarose a 1.5% como descrito adiante (1.3.4).

1.3.3. Reação em cadeia da polimerase - PCR

Neste trabalho, aplicaram-se quatro protocolos de PCR diferentes para deteção de DNA de *Leishmania*, um baseado numa sequência de DNA cinetoplastideal do minicírculo de *L. major* (LmjUni), que diferencia espécies de *Leishmania* do Velho Mundo (Anders et al, 2002), um baseado numa sequência completa de DNA cinetoplastideal do minicírculo de *L. infantum* (MC), específico para as espécies do complexo *L. donovani* s.l. no Velho e Novo Mundo (Cortes et al, 2004), um com base numa sequência de DNA nuclear da região intergénica ITS 1 do operão ribossomal, que diferencia as principais espécies no Novo e Velho Mundo (Schönian et al, 2001) e outro “Nested”, em que se efetuaram 2 reações de PCR, com base na região central do gene SSU rRNA do operão ribossomal, específico para o género *Leishmania* (van Eys et al, 1992) (Tabela 4).

Tabela 4 – Sequência dos “primers” utilizados para amplificação de DNA de *Leishmania* spp.

Protocolo	“Primers”	Sequência (5'→3')	Produto (pb)
MC	MC1	GTTAGCCGATGGTGGTCTTG	447
	MC2	CACCCATTTTCCGATTTTG	
ITS1	LITSR	CTGGATCATTTTCCGATG	311*, 335**
	L5.8S	TGATACCACTTATCGCACTT	
LmjUni	Uni21	GGGGTTGGTGTAATAAGGCC	800*, 650**
	Lmj4	CTAGTTTCCCGCCTCCGAG	
Nested	1 ^o PCR R221	GGTTCCTTTCCTGATTTACG	603
	R332	GGCCGGTAAAGGCCGAATAG	
	2 ^o PCR R223	TCCATCGCAACCTCGGT	358
	R333	AAAGCGGGCGCGGTGCTG	

Tamanho do amplicão para o DNA de * *L. infantum* e ** *L. major*; pb, pares de bases.

MC-PCR

A reação de amplificação efetuou-se numa solução com o volume final de 25 µL, contendo 5 µL de DNA da amostra, tampão de reação 1X, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 15 pmol de cada “primer” (MC1 e MC2), 1U de *Taq* polimerase e água ultra pura para perfazer o volume final. As soluções foram colocadas no termociclador, programado com as condições ótimas de amplificação (Tabela 5).

Tabela 5 – Condições de amplificação com os “primers” MC1 e MC2.

Fases da amplificação	Temperatura (°C)	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	2 min.	1
Desnaturação	94	20 seg.	30
Ligação	60	20 seg.	
Elongação	72	30 seg.	
Elongação final	72	5 min.	1

ITS1-PCR

A reação de amplificação efetuou-se numa solução com o volume final de 50 µL, contendo 2 µL de DNA da amostra, tampão de reação 1X, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 25 pmol de cada “primer” (LITSR e L5.8S), 1U de *Taq* polimerase e água

ultra pura para perfazer o volume final. As soluções foram colocadas no termociclador, programado com as condições ótimas de amplificação (Tabela 6).

Tabela 6 – Condições de amplificação com os “primers” LITSR e L5.8S.

Fases da amplificação	Temperatura (°C)	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95	2 min.	1
Desnaturação	95	20 seg.	32
Ligação	53	30 seg.	
Elongação	72	1 min.	
Elongação final	72	6 min.	1

LmjUni-PCR

A reação de amplificação efetuou-se numa solução com o volume final de 25 µL, contendo 2 µL de DNA da amostra, 12.5 µL de Biomix (Bioline), 1.5 mM MgCl₂, 25 pmol de cada “primer” (Uni21 Lmj4) e água ultra pura para perfazer o volume final. As soluções foram colocadas no termociclador, programado com as condições ótimas de amplificação (Tabela 7).

Tabela 7 – Condições de amplificação com os “primers” Uni21 Lmj4.

Fases da amplificação	Temperatura (°C)	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	5 min.	1
Desnaturação	94	30 seg.	35
Ligação	62	30 seg.	
Elongação	72	45 seg.	
Elongação final	72	6 min.	1

SSU rRNA Nested-PCR

A primeira reação de amplificação efetuou-se numa solução com o volume final de 30 µL, contendo 10 µL de DNA da amostra, tampão de reação 1X, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 15 pmol de cada “primer” (R221 e R332), 1.4U de *Taq* polimerase e água ultra pura para perfazer o volume final. As soluções foram colocadas no termociclador, programado com as condições ótimas de amplificação (Tabela 8).

Tabela 8 – Condições de amplificação com os “primers” R221 e R332 (1º PCR).

Fases da amplificação	Temperatura (°C)	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	5 min.	1
Desnaturação	94	30 seg.	35
Ligação	60	30 seg.	
Elongação	72	30 seg.	
Elongação final	72	10 min.	1

A segunda reação de amplificação efetuou-se numa solução com o volume final de 25 µL, contendo 5 µL do produto de amplificação da 1ª reação previamente diluído 1:200 em água ultra pura, tampão de reação 1X, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1.5 pmol de cada “primer” (R223 e R333), 0.7U de *Taq* polimerase e água ultra pura para perfazer o volume final. As soluções foram colocadas no termociclador, programado com as condições óptimas de amplificação (Tabela 9).

Tabela 9 – Condições de amplificação com os “primers” R223 e R333 (2º PCR).

Fases da amplificação	Temperatura (°C)	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	5 min.	1
Desnaturação	94	30 seg.	35
Ligação	65	30 seg.	
Elongação	72	30 seg.	
Elongação final	72	10 min.	1

Em todas as reações de amplificação utilizou-se como controlo positivo 1µl de DNA genómico de *L. infantum* ou de *L. major* de cultura e como controlo negativo água ultra pura em substituição do DNA.

Para o estudo da especificidade das sequências iniciadoras utilizadas no Nested-PCR, foi analisado o DNA de diversas espécies de *Leishmania*, nomeadamente *L. infantum* do Velho Mundo, *L. infantum* (sin. *L. chagasi*) do Novo Mundo, *L. donovani*, *L. archibaldi*, *L. major*, *L. tropica* e *L. braziliensis*, e de outros microorganismos¹, como *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Leptospira*, *Borrelia*, *Bartonella*,

¹ As amostras de DNA dos diversos microorganismos foram gentilmente cedidas por colegas das Unidades de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica, Microbiologia Médica e Clínica Tropical do IHMT.

Ehrlichia, *Hepatozoon*, *Babesia*, *Cercophthifilaria*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei*. Foi também incluído um grupo de amostras de DNA de sangue medular de cão não infectado.

1.3.4. Visualização dos produtos de PCR

Os fragmentos de DNA amplificado, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Citomed) a 1.5% (m/v) em tampão TAE 1X (Biorad) ao qual se adicionou brometo de etídio (Sigma) a uma concentração final de 0.5 µg/mL. O gel polimerizado foi colocado numa tina de eletroforese horizontal (Sub-cell® GT, Biorad) com tampão TAE 1X.

Aplicou-se 10 µL do produto de PCR de cada amostra diretamente no gel, uma vez que o tampão de reação já continha uma solução corante. Paralelamente às amostras, utilizou-se um marcador de 100 pares de bases (pb) (Bioline). Aplicou-se uma corrente elétrica de 120 V, durante 60 minutos. A visualização dos produtos de amplificação no gel, efetuou-se sob iluminação ultravioleta, sendo de seguida fotografados (UVIDOC, Alfagene).

1.4. Genotipagem

As amostras de DNA que resultaram em produtos de MC-PCR com banda mais intensa, foram selecionadas para posterior genotipagem, através de PCR e posterior digestão enzimática (PCR-RFLP, PCR- “Restriction fragment length polymorphism), utilizando-se 6 enzimas de restrição: *Bgl*III, *Scr*FI, *Dde*I, *Hpa*II, *Rsa*I e *Vsp*I (Cortes et al, 2006).

Resumidamente, preparou-se uma solução com o volume final de 20 µL, contendo 6 µL de produto de MC-PCR, tampão de reação 1X (Biolabs) (específico para cada enzima), 10U de cada enzima e água ultra pura para perfazer o volume final. As soluções foram incubadas a 37°C ± 1°C, em banho-maria (Julabo) durante a noite.

Os produtos que apresentaram bandas inespecíficas, foram purificadas diretamente do gel de agarose, utilizando o “kit” comercial “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche) de acordo com as instruções do fabricante.

Cada padrão de restrição resultante da hidrólise dos produtos de MC-PCR pelas endonucleases, contribuiu para a determinação de um genótipo (Tabela 1 e 2, Anexo 1).

1.5. Visualização dos produtos de MC-PCR-RFLP

Os fragmentos de restrição, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 3% (m/v) em tampão TAE 1X, como descrito em **2.3.4**.

Aplicou-se 10 µL do produto de restrição com 2 µL de corante azul de bromofenol no gel. Simultaneamente com as amostras, colocou-se um marcador de 50 pb. Aplicou-se uma corrente elétrica de 110 V, durante 150 minutos. A visualização dos produtos de restrição, efetuou-se sob iluminação ultravioleta, sendo de seguida fotografados.

A extração de DNA, a preparação das misturas de reação, a amplificação de DNA por PCR, a eletroforese e a genotipagem, foram realizadas em áreas separadas e em tempos diferentes, de forma a evitar possíveis contaminações.

2. Ensaios “in vitro” de estirpes parentais e híbridas de *Leishmania*

2.1. Estirpes de *Leishmania*

Nos ensaios referentes a este sub-capítulo, utilizaram-se oito estirpes de *Leishmania* (Tabela 10). Os parasitas foram cultivados em meio líquido de alto rendimento Schneider, suplementado com 20% de SFB (v/v). As culturas foram incubadas a 24°C ±1°C, procedendo-se duas vezes por semana, à adição de meio de cultura para obtenção da concentração parasitária adequada a cada estudo. Todo o processamento de culturas foi efetuado em ambiente estéril em câmara de fluxo laminar.

Tabela 10 – Estirpes de *Leishmania* utilizadas.

Espécie	Estirpe	Código internacional da OMS	Patologia
<i>L. infantum</i>	IMT 151	MHOM/PT/88/IMT151	LV
	IMT 373	MCAN/PT/05/IMT373	Lcan
	IMT 316	MCAN/PT/03/IMT316	Lcan
<i>L. major</i>	LEM 2164	MHOM/MA/90/LEM2164*	LC
	LV 561	MHOM/IL/67/LRC-L137 Jericho II**	LC
<i>L. infantum/L. major</i>	IMT 208	MHOM/PT/94/IMT208	LV
	IMT 211	MHOM/PT/94/IMT211	LV
	IMT392	MHOM/PT/2011/IMT392	LV

Gentilmente cedida por: *Centre National de Référence des *Leishmania*, Montpellier, França; **Professor Petr Volf da Faculdade de Ciências da Charles University, Praga, República Checa. LV, Leishmaniose visceral; Lcan, Leishmaniose canina; LC, Leishmaniose cutânea.

2.2. Ensaios “in vitro” com promastigotas de *Leishmania*

2.2.1. Dinâmicas de crescimento e densidades parasitárias

Para este estudo foram selecionadas cinco estirpes de *Leishmania* referidas: duas *L. infantum* (IMT 151 e IMT 316), uma *L. major* (LEM 2164) e duas estirpes híbridas *L. infantum/L. major* (IMT 208 e IMT 211).

As estirpes foram mantidas em cultura como descrito em 2.1., sendo posteriormente ajustada a concentração para 1E+05 promastigotas/mL em meio Schneider. A concentração de parasitas foi determinada por contagem das formas promastigotas viáveis, em duplicado, em hemacitômetro de Neubauer (Brand) ao microscópio numa ampliação de 400 x (Figura 11).

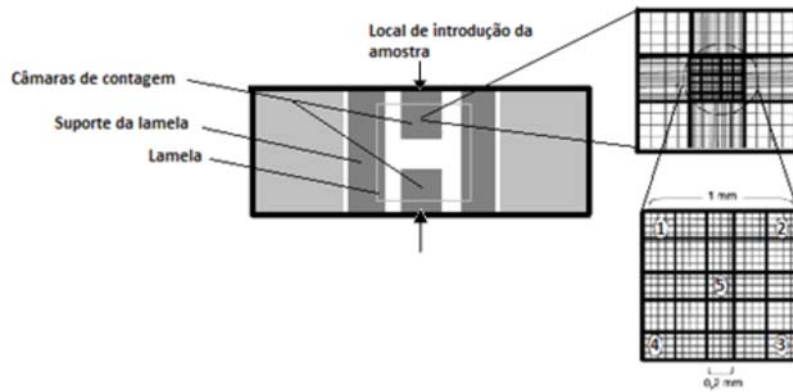


Figura 11 – Representação de um hemacitômetro (Adaptado de: IDRC, n.d.).

1-5, esquadrias em que foi efetuada a contagem dos promastigotas.

Foram colocados 2 mL de cultura por poço em placa de 24 poços (Brand), em duplicado para cada estirpe, com um poço de intervalo de forma a prevenir a contaminação entre replicados (Figura 12). As culturas foram incubadas a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 12 dias, sem adição de novo meio. Durante o tempo de incubação não foi adicionado meio às culturas.

	1	2	3	4	5	6
A	IMT 151		IMT 151		IMT 316	
B		IMT 316		IMT 208		IMT 208
C	IMT 211		IMT 211		LEM 2164	
D		LEM 2164		Meio		Meio

Figura 12 – Esquema da placa de 24 poços com a disposição das estirpes estudadas.

A curva de crescimento dos parasitas foi determinada através de contagens diárias, durante 12 dias. Para o cálculo da concentração de parasitas, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$[\text{Parasitas}] = \frac{(C1+C2)}{2} \times \text{fator de diluição} \times 50 \times 10^3 \text{ promastigotas/mL}$$

Onde C1 e C2 correspondem às contagens dos parasitas nas duas câmaras do hemacitômetro, 50 a profundidade do hemacitômetro das 5 esquadrias utilizadas (mm) e 10^3 o volume (mm^3) da esquadria total.

Foram contabilizadas as formas promastigotas totais, registrando-se a percentagem de formas promastigotas metacíclicas (Grimm et al, 1991). Todos os ensaios foram efetuados em duas experiências independentes e em quadriplicados.

Ao longo deste ensaio, efetuaram-se esfregaços das culturas nos 3º, 6º e 9º dias, para análise morfométrica dos parasitas. Os parasitas foram fixados com metanol e corados com Giemsa, efetuando-se as medições do comprimento das formas promastigotas em microscópio ótico (Eclipse80, Nikon) com uma ampliação de 1000X. Para cada estirpe foram efectuadas 20 contagens independentes e com recurso ao programa de imagem NIS – Elements BR (Nikon).

2.2.2. Avaliação de “stress” oxidativo

Para cada uma das cinco estirpes de *Leishmania* anteriormente utilizadas, em fase exponencial de crescimento (4-5º dia), submeteram-se $1\text{E}+07$ promastigotas/mL em meio Schneider (volume necessário para colocar 50 μL de cultura/poço numa placa de 96 poços), a um gradiente de concentração de 100 μM a 1000 μM de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Figura 13). As placas foram posteriormente incubadas a $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 2 horas.

Após a incubação, adicionou-se 50 μL /poço da mistura de XTT (Roche Diagnostics) a uma concentração de 0.3 mg/mL, de acordo com as instruções do fabricante e incubou-se a $24^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 horas, protegido da luz. O XTT é um método colorimétrico baseado na redução do sal de tetrazólio (sódio-2,3-bis-[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazólio-5-carboxanilida) através das desidrogenases mitocondriais do parasita. O

sal passa da cor amarela para uma coloração alaranjada quando sofre redução, possibilitando a quantificação por espectrofotometria (Williams et al, 2003).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 μ M	200 μ M	300 μ M	400 μ M	500 μ M	600 μ M	700 μ M	800 μ M	900 μ M	1000 μ M	A	B
B											Meio	
C												
D											WT	
E												
F												
G												
H												

Figura 13 – Esquema da placa de 96 poços com disposição das concentrações de H₂O₂ utilizadas.

A, 100 μ M de H₂O₂; B, 1000 μ M de H₂O₂; WT, Wild type.

A absorvância foi lida em espectrofotômetro (Awareness, Stat fax® 3200) com um comprimento de onda de 450 nm, utilizando-se um filtro de referência de 630 nm (Wilson et al, 1994). Foram efetuados três ensaios independentes para cada estirpe com 8 replicados para cada concentração. Foram determinadas as curvas de viabilidade e calculadas as concentrações de H₂O₂ necessárias para inibir 50% dos parasitas em cultura (CI₅₀).

2.2.3. Avaliação de “stress” nutricional

Para avaliar a viabilidade de cada estirpe, à depleção de nutrientes contidos no meio de cultura, as culturas foram ajustadas para uma concentração de 5E+05 promastigotas/mL e estudou-se a taxa de sobrevivência “in vitro”, através de diluições de Schneider suplementado, em várias concentrações de tampão fosfato salino (PBS, BioWhittaker) (Tabela 11).

Tabela 11 – Percentagens de meio de cultura Schneider em PBS (v/v).

Percentagem de “stress” (%)	Percentagem de Schneider em PBS (%)
100	0
99	1
75	25
50	50
25	75
0	100

Para cada uma das diferentes concentrações de Schneider/PBS, foram colocados 2 mL/poço da suspensão parasitária, numa placa de 24 poços, em duplicado para cada estirpe, com um poço de intervalo de forma a prevenir a contaminação entre replicados. As culturas foram incubadas durante uma semana, efetuando-se, ao fim desta semana, uma sub-passagem num fator de diluição de 1:10, para uma nova placa de 24 poços e novo meio de cultura idêntico ao inicialmente utilizado. Após uma semana de incubação, efetuou-se uma nova sub-passagem num fator de diluição de 1:10, para uma nova placa de 24 poços com meio Schneider completo. As culturas foram observadas e os parasitas contados diariamente de forma a avaliar a sua viabilidade (Lewis et al, 2009).

2.2.4. Suscetibilidade “in vitro” de *Leishmania* spp. a Anfotericina B

Para este estudo foram selecionadas sete estirpes: duas *L. infantum* (IMT 151 e IMT 373), duas *L. major* (LEM 2164 e LV 561) e três estirpes híbridas *L. infantum/L. major* (IMT 208, IMT 211 e IMT392). As estirpes foram mantidas em cultura como descrito em 2.1., sendo posteriormente ajustada a sua concentração.

2.2.4.1. Avaliação da suscetibilidade dos parasitas

Para avaliar a susceptibilidade das estirpes de *Leishmania* spp. à Anfotericina B (AnfB), submeteram-se $1E+06$ promastigotas/mL em meio RPMI (Sigma) suplementado com 10% de SFB (v/v), em fase estacionária, e colocados 100 µL de cultura/poço numa placa de 96 poços, e 100 µL/poço de um gradiente de concentração de AnfB de 12.0 a 0.0625 µg/mL (Figura 14). De forma a controlar a evaporação do meio de cultura,

durante a incubação, colocaram-se 200 μ L de PBS 1X, nos poços exteriores. Incubaram-se as placas de 96 poços a 24°C \pm 1°C durante 48 horas.

Após a incubação, adicionou-se 20 μ L/poço da mistura de MTT a uma concentração de 5 mg/mL em PBS 1X e incubou-se a 24°C \pm 1°C durante 4 horas, protegido da luz. O método colorimétrico que utiliza o reagente de MTT é baseado na redução do sal de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio) através das desidrogenases mitocondriais do parasita à semelhança do método que utiliza o XTT. O sal passa da cor amarela para uma coloração violácea/violeta quando sofre redução, possibilitando a quantificação por espectrofotometria.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
B	P	12 μ g/mL	:							0.0625 μ g/mL	NT	P
C	P											P
D	P											P
E	P											P
F	P											P
G	P											P
H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

Figura 14 – Esquema da placa de 96 poços com disposição das concentrações de Anfotericina B utilizadas.

P, PBS; NT, Estirpe não tratada.

A absorvância foi lida em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 595 nm. Foram efetuados três ensaios independentes para cada estirpe com 6 replicados para cada concentração. Foram calculados as CI₅₀, através do programa GraphPad Prism 5.0.

2.2.4.2 Avaliação da citotoxicidade e do índice de seletividade

Determinou-se a dose letal de AnfB que mata 50% das células do hospedeiro (DL₅₀). Para tal, utilizou-se a linha celular comercial RAW 264.7 (*Abelson murine leukemia virus-induced tumor*: ATCC® TIB-71™, proveniente de murganho BALB/c (*Mus musculus*), contendo monócitos e macrófagos. A manutenção desta linha encontra-se descrita no ponto 2.3.1.. Após contagem das células e avaliação da sua viabilidade no

contador de células “CASY Counter” (Innovatis), ajustou-se a concentração para $5E+05$ células/mL. A citotoxicidade da AnfB, na linha celular RAW264.7, foi estabelecida, através do método colorimétrico MTT já descrito, com exceção da temperatura de incubação, a qual foi $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com uma atmosfera de 5% de CO_2 (Heraeus).

O índice de seletividade (IS), determinou-se pela razão entre o DL_{50} obtido para a linha celular RAW264.7 e o CI_{50} de cada estirpe de *Leishmania*, como descrito por Weninger et al. (2001).

2.3. Ensaios “in vitro” com amastigotas de *Leishmania*

2.3.1. Linhas celulares

Foram utilizadas duas linhas celulares: RAW 264.7 (descrita em 2.2.4.2.) e outra não aderente, humana (*Homo sapiens*), contendo monócitos: U-937 (*Human histiocytic lymphoma*: ATCC® CRL-1593.2™).

De forma a manter a sincronização do crescimento celular de ambas as linhas, determinou-se que as subculturas fossem efetuadas às 2^{as}, 4^{as} e 6^{as} feiras, mantendo sempre uma concentração celular entre $1E+05$ e $2E+06$ células/mL, fazendo-se uma diluição de 1:3, conforme recomendado nas fichas técnicas das respectivas linhas celulares. As culturas foram incubadas em posição vertical (U-937) ou horizontal (RAW 264.7) a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com uma atmosfera de 5% de CO_2 .

2.3.2. Diferenciação de linhas celulares

Uma vez que as linhas celulares utilizadas não são diferenciadas em macrófagos, procedeu-se à otimização da sua diferenciação utilizando PMA (“phorbol myristic acid”, Sigma), numa concentração de 100 ng/mL em meio de cultura líquido RPMI suplementado.

O PMA é um diéster de forbol e um forte promotor tumoral e ativador das vias de transdução de sinal das proteínas cinases C, induzindo a proliferação e transformação celular (Castagna, 1982).

Em ambiente estéril, pipetou-se 50 μL de cultura celular previamente homogeneizada para um tubo de plástico com 10 mL da solução de diluição “easy toner”, procedendo-se à determinação da concentração celular no contador de células “CASY Counter”.

Ajustou-se a concentração das linhas celulares U-937 para $5\text{E}+05$ células/mL e da RAW 264.7 para $1\text{E}+05$ células/mL, uma vez que se verificou que a última possui uma velocidade de crescimento superior, centrifugando a 118 g, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. O sedimento foi posteriormente ressuspensionado em RPMI com 100 ng/mL de PMA.

Após homogeneizar a cultura de células, incubou-se 300 μL /poço da suspensão celular numa lâmina de 8 poços (LabteK, Nunc) (Figura 15). As culturas foram incubadas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ com uma atmosfera de 5% de CO_2 , com diferentes tempos de incubação: 24, 48 e 72 horas.



Figura 15 – Lâminas com câmara de 8 poços. (Adaptado de: Amazon, 2013).

Após o tempo de incubação, os macrófagos diferenciados, aderentes ao fundo dos poços, foram lavados com PBS 1X, para remover o meio e as células não diferenciadas na suspensão.

As lâminas foram secas ao ar, fixadas com metanol e coradas com Giemsa (1 gota/mL de água, 10 minutos) (Figura 16). Após coloração com Giemsa efetuaram-se preparações definitivas, colocando uma gota de Entellan (Sigma), uma lamela de vidro comprida, calcando a mesma até todo o Entellan ficar espalhado por baixo desta.



Figura 16 – Coloração de lâminas com Giemsa (Fotografia da autora).

As lâminas contendo as duas linhas celulares diferenciadas com os diferentes tempos de incubação foram observadas ao microscópio óptico numa ampliação de 1000 x, tendo-se determinado o tempo de diferenciação ótimo para ambas.

2.3.3. Infecção de linhas celulares

Nesta experiência selecionaram-se as estirpes de *Leishmania* utilizadas em 2.2.4. Conforme descrito em 2.3.2., efetuou-se previamente a diferenciação de ambas as linhas celulares.

Os macrófagos diferenciados, aderentes ao fundo dos poços, foram lavados com RPMI suplementado, para remover o meio e as células não diferenciadas na suspensão.

As concentrações dos parasitas das várias estirpes, em fase estacionária, foram ajustadas para $2,5 \times 10^6$ promastigotas/mL (U-937) e $2,5 \times 10^5$ promastigotas/mL (RAW 264.7) e 300 μ L de suspensão de parasitas foi adicionada a cada poço contendo os macrófagos diferenciados, para uma proporção final de 5 parasitas : 1 macrófago e 2.5 parasitas : 1 macrófago, respetivamente.

As culturas foram incubadas novamente a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ com uma atmosfera de 5% de CO_2 , durante 48 horas. Após o tempo de incubação, os macrófagos infetados, foram cuidadosamente lavados com PBS 1X, para remover o meio contendo os parasitas não internalizados. As lâminas foram secas ao ar, fixas com metanol e coradas com Giemsa

(1 gota/mL de água, durante 10 minutos) tendo posteriormente sido efetuadas as preparações definitivas.

As lâminas foram observadas ao microscópio ótico numa ampliação de 1000 x, tendo-se determinado as taxas de infeção para cada estirpe de *Leishmania* (nº de macrófagos infetados em cada 100 macrófagos contados aleatoriamente) e a intensidade de infeção (nº de parasitas por macrófago em cada 100 macrófagos contados aleatoriamente).

2.4. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software “Statistical Package for Social Sciences” versão 21.0 (SPSS®) para o Windows XP.

Após a verificação dos pressupostos necessários para a realização do teste paramétrico ANOVA one way, decidiu-se utilizar o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para comparar o comprimento do corpo celular dos promastigotas, ao longo do tempo (2.2.1). Os resultados foram representados como valores médios \pm desvio padrão. As diferenças foram consideradas significativas a um nível de significância de 5% ($p < 0.05$) (Pereira, 2002).

O teste não paramétrico de Friedman foi utilizado para comparar as percentagens de viabilidade entre as estirpes ao longo das concentrações de H₂O₂ (2.2.2). Os resultados foram representados como valores médios \pm desvio padrão. Quando a hipótese nula foi rejeitada, múltiplas comparações foram realizadas para determinar quais as estirpes que diferem entre si, utilizando um nível de significância de 5% ($p < 0.05$) (Mello, 1997).

O teste não paramétrico Qui-Quadrado foi utilizado para comparar as taxas de infeção entre as diferentes estirpes e a permissividade de infeção das duas linhas celulares utilizadas (2.3.3). Os resultados foram representados como valores médios \pm desvio padrão. Quando a hipótese nula foi rejeitada, múltiplas comparações foram realizadas para determinar qual as estirpes estatisticamente diferentes, utilizando um nível de significância de 5% ($p < 0.05$) (Pereira, 2002).

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ocorrência de estirpes híbridas entre diferentes espécies de *Leishmania* tem sido descrita em várias regiões endêmicas (Ravel et al, 2006; Noyes et al, 1996; Dujardin et al, 1995). *L. infantum* e *L. major* são duas espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, pertencentes aos complexos *L. donovani* e *L. major*, respetivamente. São filogeneticamente distanciadas e causam diferentes quadros clínicos.

1. Pesquisa de novas espécies de *Leishmania*

Um total de 229 amostras de sangue medular canino, correspondentes a 229 cães provenientes da região de Trás-os-Montes e Alto-Douro, foram recebidas no Laboratório de Leishmanioses do IHMT. Do total de amostras provenientes de cães, 79 foram classificadas como aparentemente saudáveis (AS - ausência de sinais clínicos) e 150 de cães clinicamente suspeitos (PS - presença de sinais clínicos).

1.1. Exame parasitológico cultural

Das 229 culturas efetuadas, foram isoladas três estirpes de *Leishmania*. As três estirpes isoladas pertenciam a três cães PS; um cão sem raça determinada (SRD) com emaciação, um cão SRD com onicogrifose e úlceras no pavimento auricular e um Husky Siberiano com conjuntivite, descamação e emagrecimento.

O baixo limiar de deteção da presença do parasita obtido com técnicas parasitológicas culturais, já descrito por outros autores (Osman et al, 1997; Ashford et al, 1995), vem reforçar a necessidade de recorrer a técnicas mais sensíveis para o diagnóstico desta doença, como é o caso do diagnóstico molecular por PCR.

1.2. Deteção de DNA de *Leishmania*

Após a extração de DNA de todas as amostras, efetuou-se a amplificação do gene da β -actina canina, num total de 25 amostras de DNA aleatórias, das diferentes datas de

extração, de forma a avaliar a eficácia da extração de DNA. Em todas estas amostras obteve-se um produto de amplificação de 283 pb, correspondente ao amplicão da sequência em estudo, validando a metodologia de extração de DNA utilizada, para posterior utilização destas amostras nos estudos seguintes.

Avaliou-se a presença de DNA de *Leishmania* nas amostras estudadas, utilizando-se quatro protocolos de PCR diferentes, permitindo a diferenciação ao nível do género (SSU rRNA Nested-PCR) e ao nível da espécie (MC-PCR, ITS1-PCR e LmjUni-PCR). Os protocolos de MC-PCR, ITS1-PCR e LmjUni-PCR revelaram DNA de *L. infantum* com um amplicão correspondente ao esperado para cada um dos protocolos (447 pb, 311 pb e 800 pb, respetivamente) (Figura 17), enfatizando a presença desta espécie em Portugal, na região de Trás-os-Montes e Alto-Douro.

Das amostras analisadas neste estudo, além de DNA de *L. infantum* – espécie endémica em Portugal -, não foi detetado DNA de outras espécies de *Leishmania*, ou de “novas espécies” híbridas, nomeadamente estirpes *L. infantum/L. major* já anteriormente identificadas em Portugal (Ravel et al, 2006).

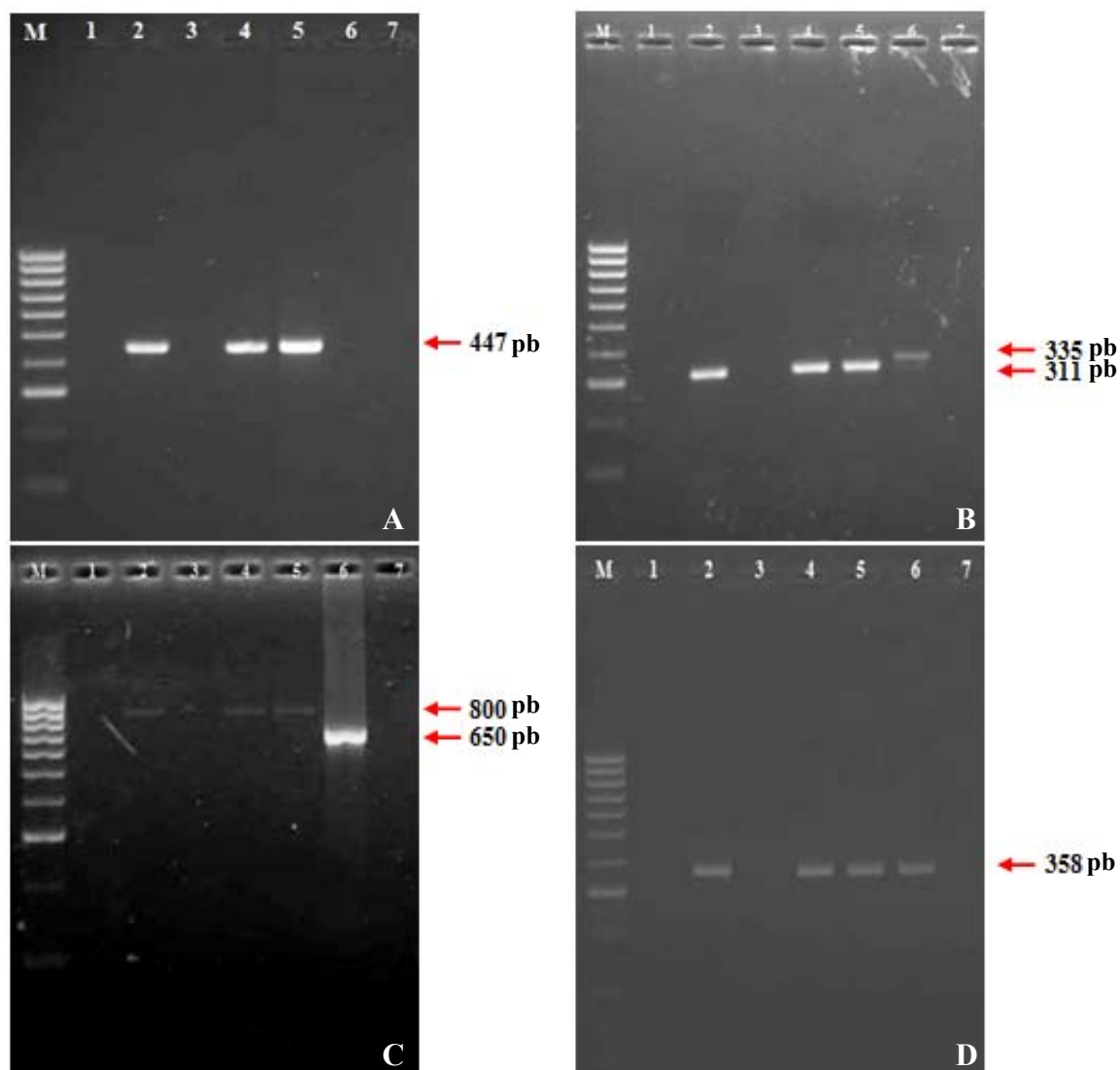


Figura 17 – Produtos de amplificação, obtidos com os quatro protocolos de PCR.

A) MC-PCR, B) ITS1-PCR, C) LmjUni-PCR; D) SSU rRNA Nested-PCR. M, marcador de 100 pb; 1, amostra negativa; 2, amostra positiva; 3, amostra negativa; 4, amostra positiva; 5, Controlo *L. infantum*; 6, Controlo *L. major*; 7, Controlo negativo (H₂O). Seta a vermelho indica o tamanho do amplicão.

De uma forma geral, verificou-se uma maior percentagem de amostras positivas com o protocolo SSU rRNA Nested-PCR (37.55%), tendo o ITS1-PCR apresentado o menor número de amostras positivas (8.73%) (Tabela 12).

Tabela 12 – Amostras positivas com os diferentes protocolos de PCR na presença/ausência de sinais clínicos de Leishmaniose canina (n=229).

Protocolo	Nº amostras positivas		Nº total de amostras positivas	% de amostras positivas
	PS	AS		
MC-PCR	28	5	33	14.41
ITS1-PCR	18	2	20	8.73
SSU rRNA Nested-PCR	66	20	86	37.55
LmjUni-PCR	23	10	33	14.41

PS, Presença de sinais clínicos; AS, Ausência de sinais clínicos.

Em todos os protocolos, a detecção de DNA parasitário foi superior nos cães PS, tendo-se obtido um total de 105 (45,85%) amostras positivas por pelo menos um dos protocolos. No entanto, foi com o protocolo do SSU rRNA Nested-PCR que se observou uma maior percentagem de amostras positivas. Este protocolo revelou ser o mais sensível e por isso uma ferramenta importante para detetar DNA de *Leishmania*, sobretudo nos AS, permitindo uma possível intervenção nas fases iniciais da doença.

É conhecido o elevado número de infeções assintomáticas por *Leishmania* sp. Cardoso et al (2004) também salientam esta elevada percentagem de infeções assintomáticas, tendo observado que em 60 animais seropositivos, 51 (85%) não tinham sinais clínicos compatíveis com Lcan. Resultados similares foram encontrados em outras áreas da Bacia mediterrânica, nomeadamente em Portugal, Espanha, Turquia e Córsega (Cortes et al, 2012a; Solano-Gallego et al, 2001; Ozbil et al, 2000; Neogy et al, 1992). A elevada percentagem de infeções assintomáticas poderá estar relacionada com animais que desenvolveram algum nível resposta imune celular ao longo do tempo e que se acredita limitar a evolução da doença (Cabral et al, 1998).

Apesar de alguns autores descreverem que a infeciosidade aumenta com o aumento de severidade da doença, isto é, os cães com sinais clínicos têm maior probabilidade de transmitir os parasitas aos vetores flebotomíneos, do que os cães sem sinais clínicos aparentes (Quinnell e Courtenay, 2009; Michalsky et al, 2007), é importante salientar, que os últimos, podem também contribuir para a transmissão do parasita (Campino e Maia, 2012; Guarga et al, 2000). Estes cães poderão atuar como reservatórios levando à

disseminação da doença e aumento da sua prevalência quer noutros canídeos quer em humanos, sendo por isso importante utilizar medidas de controlo em animais com e sem sinais clínicos aparentes (Campino e Maia, 2012; Baneth, 2008).

O protocolo MC-PCR, que permite a deteção de DNA de *Leishmania* do complexo *L. donovani*, ou seja identificação de *L. infantum* e *L. donovani* (Cortes et al, 2004), permitiu a deteção de 33 amostras positivas (Figura 17 A). Apesar de este protocolo não ser o mais sensível, apresenta como vantagem, em relação aos outros protocolos, a possibilidade de identificação e genotipagem por PCR-RFLP de amostras de *L. infantum* em Portugal, uma vez que esta é a espécie prevalente no nosso país (Campino et al, 2006; Cortes et al, 2006).

O protocolo ITS1-PCR, revelou ser o menos sensível tendo apenas detetado 20 amostras positivas de um total de 105 amostras positivas.

Já o protocolo LmjUni-PCR demonstrou uma maior sensibilidade, tendo detetado 33 amostras positivas. Este último protocolo, apresentou como principal desvantagem a frequente amplificação de produtos inespecíficos e ainda, analisando a intensidade da banda de eletroforese (Figura 17 C), um baixo número amplicões para DNA de *L. infantum* comparativamente a DNA de *L. major*. Este fato poderá estar relacionado com os “primers” Lmj4 e Uni21, os quais foram desenhados com base na sequência do mini-círculo de *L. major* (Anders et al, 2002).

O protocolo SSU rRNA Nested-PCR revelou uma elevada sensibilidade. No entanto, verificou-se uma facilidade de contaminação entre amostras positivas e negativas, possivelmente relacionado com a quantidade de amplicões gerados na primeira PCR e a diluição do primeiro produto de PCR e utilização desta diluição para a segunda PCR. Para diminuir a possibilidade de falsos positivos, para as amostras positivas no SSU rRNA Nested-PCR e negativas com os outros protocolos (MC-PCR, LmjUni-PCR e ITS1-PCR), repetiu-se posteriormente o PCR, colocando aleatoriamente controlos negativos entre amostras. Todos os resultados foram concordantes com os anteriormente obtidos.

Foi avaliada a especificidade do protocolo SSU rRNA Nested-PCR. Este protocolo não se mostrou 100% específico para *Leishmania*, uma vez que amplificou DNA de outros microorganismos como *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum*, *Cryptococcus*

neoformans e *Borrelia garinii* (Figura 18). van Eys et al (1992) testaram a especificidade destes primers, utilizando DNA de *Crithidia fasciculata*, *T. brucei*, *Escherichia coli*, *Phlebotomus guggisbergi* e *Homo sapiens*, tendo igualmente obtido amplificação com *T. brucei* e ainda *C. fasciculata*. Apesar de ser pouco provável a presença destes microorganismos no tipo de amostra biológica utilizada (sangue medular canino) e na região geográfica em estudo, não se deverá ignorar a falta de especificidade deste protocolo. Ainda, o protocolo de SSU rRNA Nested-PCR não permite a diferenciação da espécie, uma vez que diferencia só até ao nível do género, ao contrário dos protocolos baseados no DNA cinetoplastideal (LmjUni-PCR e MC-PCR) e na região ITS1 que permitem a identificação de espécies de *Leishmania* (Schönian et al, 2003; Anders et al, 2002).

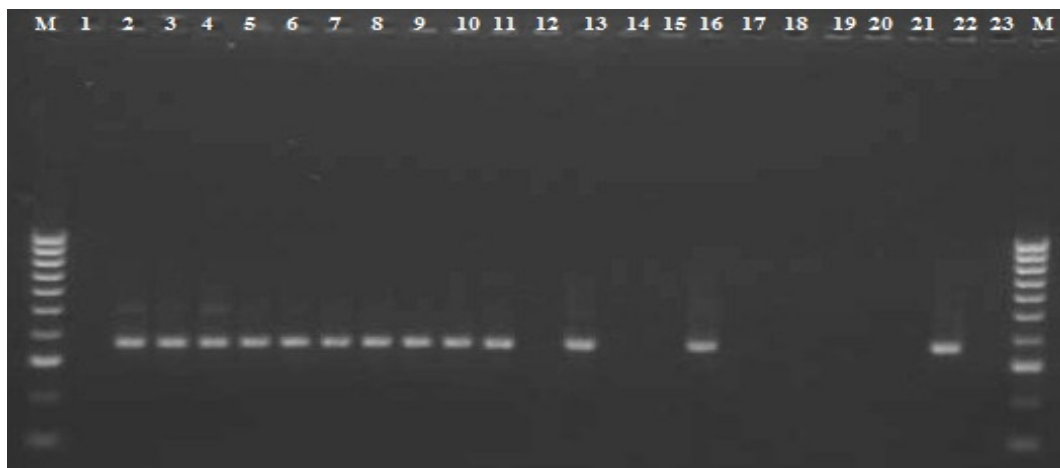


Figura 18 – Produtos de amplificação de SSU rRNA Nested-PCR.

M, marcador de 100 pb; 1, Amostra de sangue medular negativa para DNA de *Leishmania*; 2, Amostra de sangue medular positiva para DNA de *Leishmania* (previamente negativa por MC-PCR, LmjUni-PCR e ITS1-PCR); 3, Amostra de sangue medular positiva para DNA de *Leishmania* (previamente negativa por MC-PCR, LmjUni-PCR e ITS1-PCR); 4, *L. infantum* do Velho Mundo; 5, *L. infantum* (= *L. chagasi*) do Novo Mundo; 6, *L. donovani*; 7, *L. archibaldi*; 8, *L. major*; 9, *L. tropica*; 10, *L. braziliensis*; 11, *T. brucei*; 12, *T. cruzi*; 13, *P. falciparum*; 14, *Hepatozoon*; 15, *Babesia*; 16, *C. neoformans*; 17, *C. parapsilosis*; 18, *Cercopithifilaria*; 19, *Bartonella*; 20, *Ehrlichia*; 21, *Leptospira*; 22, *B. garinii*; 23, Controlo negativo (H₂O).

Estes resultados demonstram a importância de uma seleção adequada do método molecular a utilizar, assim como de usar mais do que um alvo molecular para a detecção do DNA do parasita, consoante o objetivo do estudo (Schönian et al, 2008).

1.3. Genotipagem

A diversidade genética de populações parasitárias de *Leishmania* spp., tem sido estudada com base em diferentes marcadores moleculares (revisto por Schönian et al, 2010; 2008). O kDNA tem sido um dos alvos moleculares mais utilizados quer no diagnóstico molecular, quer em genotipagem de diferentes espécies e estirpes de *Leishmania* (Cortes et al, 2006; Ferroglia et al, 2006; Cortes et al, 2004; Noyes et al, 1998). Neste trabalho foi efetuada a metodologia de kDNA-PCR-RFLP a partir dos produtos de MC-PCR, de acordo com o protocolo desenvolvido por Cortes et al (2006).

Do total das 33 amostras que deram positivas pelo MC-PCR, apenas 16 apresentaram uma banda suficientemente forte para considerar o seu produto para restrição enzimática.

As amostras genotipadas, foram recolhidas de dezasseis cães com a seguinte caracterização clínica: dois cães sem sinais clínicos aparentes e catorze cães com os seguintes sinais clínicos: lesões cutâneas, úlceras nasais, emaciação, emagrecimento, atrofia muscular, úlceras de decúbito, alopecia periocular, descamação furfurácea, onicogribose, úlceras nos pavimentos auriculares e conjuntivite. Dois dos cães com sinais clínicos, foram testados contra a presença de anti-corpos anti-*Leishmania* utilizando um teste rápido (“SpeedLeish”), os quais tiveram resultado positivo.

Todas as amostras (n=16) incluídas nesta análise, originaram um a três fragmentos de hidrólise para as diferentes endonucleases (Figura 19).

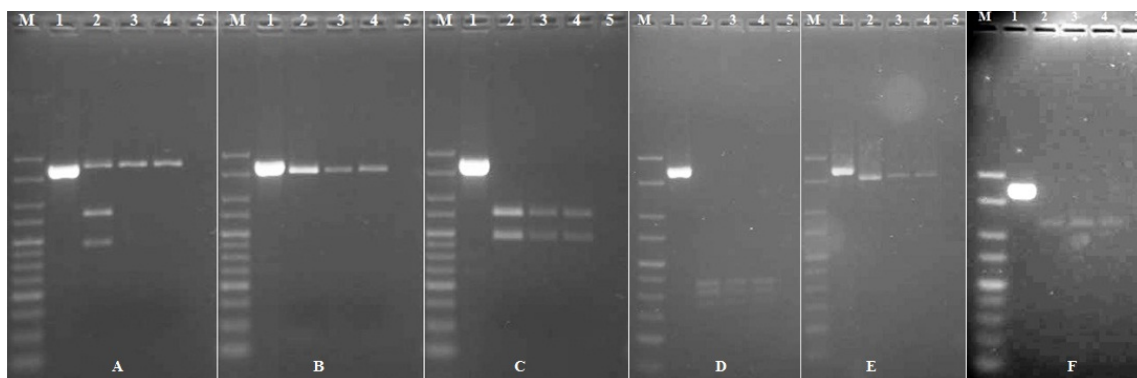


Figura 19 – Produtos de restrição de MC-PCR-RFLP.

A) *Bgl*II, B) *Scr*FI, C) *Rsa*I, D) *Vsp*I, E) *Hpa*II, F) *Dde*I. M, Marcador 50 pb; 1, produto não hidrolisado; 2, controlo positivo genótipo A; 3, amostra positiva genótipo B; 4, amostra positiva genótipo B; 5, controlo negativo – sem DNA.

Efetuuou-se uma análise combinada dos segmentos de restrição do kDNA obtido com cada uma das seis enzimas de restrição (Anexo 1, Tabela 1 e 2) e identificou-se um único perfil de restrição ou genótipo comum às 16 amostras analisadas – o genótipo B (Figura 20). Este resultado vem suportar os dados anteriormente descritos, como sendo o genótipo B o segundo mais frequente em Portugal e o mais frequente na região de Trás-os-Montes e Alto-Douro (Cortes et al, 2006). É importante notar, que o genótipo B é o ancestral comum de vários genótipos presentes em Portugal, nomeadamente o genótipo A, o mais comum na população portuguesa, e ainda, que o genótipo B, foi identificado quer em estirpes provenientes de humanos, de caninos e de flebótomos.

Apesar de terem sido estudadas apenas amostras do reservatório canino, o MC-PCR.RFLP, além de esclarecer o genótipo das estirpes de *Leishmania* circulantes na zona estudada, permite ainda inferir sobre o ciclo de transmissão do parasita (Schönian et al, 2008; Cortes et al, 2006; Cupolillo et al, 2003).

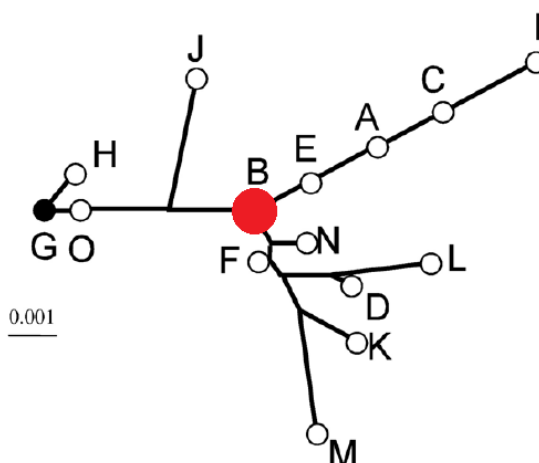


Figura 20 – Árvore filogenética contendo genótipos encontrados em diferentes estirpes de *L. infantum* e *L. donovani* isoladas a partir dos hospedeiros humano e canino e vetor. A bola a vermelho representa o genótipo B, encontrado nas amostras caninas analisadas (Adaptado de: Cortes et al, 2006).

2. Ensaio “in vitro” de estirpes parentais e híbridas de *Leishmania*

Um dos objetivos deste estudo foi a pesquisa de “novas espécies” ou híbridos de *Leishmania* em Portugal, e posterior estudo do seu comportamento biológico. Uma vez que não foram encontradas “novas espécies”, efetuaram-se os diferentes estudos “in vitro” apenas com espécies de *L. infantum* e *L. major* e híbridas *L. infantum/L. major*, previamente isoladas.

2.1. Ensaio “in vitro” com promastigotas de *Leishmania*

Neste capítulo avaliou-se o comportamento biológico de diferentes estirpes das espécies de *L. infantum*, *L. major* e híbridas *L. infantum/L. major*, procurando comparar os seus fenótipos, quando expostos a diferentes ambientes.

2.1.1. Dinâmicas de crescimento e densidades parasitárias

Para esta experiência, foram avaliadas, durante 12 dias, as dinâmicas de crescimento e as densidades parasitárias (padrões de crescimento) de cinco estirpes de *Leishmania*:

duas *L. infantum* (IMT 151 e IMT 316), uma *L. major* (LEM 2164) e duas estirpes híbridas *L. infantum/L. major* (IMT 208 e IMT 211).

De um modo geral, observaram-se padrões de crescimento distintos entre as diferentes estirpes estudadas, mesmo dentro da mesma espécie (Figura 21) à semelhança de outros estudos realizados em promastigotas de *Leishmania* do Velho e Novo Mundos (Cortes et al, 2012b; Kbaier-Hachemi et al, 2011). Por outro lado, todas as curvas de crescimento demonstraram o maior pico de densidade parasitária ao 6º dia (variando entre 1.93E+07 e 2.51E+07 promastigotas/mL), exceto a curva da estirpe *L. infantum* IMT 316, cujo pico de densidade parasitária foi atingido ao 7º dia, evidenciando uma menor densidade parasitária (7.13E+06 promastigotas/mL). Ao 12º dia, à exceção da IMT 316, todas as estirpes tiveram densidades parasitárias idênticas.

Relativamente à percentagem de formas promastigotas metacíclicas, estas variaram entre 1.55% e 21.69%. Esta baixa percentagem de formas promastigotas metacíclicas foi já descrita por outros autores, nomeadamente em *L. infantum* do Velho Mundo, cuja percentagem não ultrapassou os 6% (Kbaier-Hachemi et al, 2011). Verificou-se ainda para as estirpes de *L. infantum* (IMT 151 e IMT 316), que a percentagem de formas promastigotas metacíclicas foi superior nos primeiros dias, em relação às estirpes híbridas (IMT 208 e IMT 211) e nestas, em relação à estirpe de *L. major* (LEM 2164). Para todas as estirpes, a percentagem mais elevada de promastigotas metacíclicos foi observada próxima do pico de parasitas totais. Também Kbaier-Hachemi et al (2011), descrevem este fenómeno, sublinhando o fato da metaciclogénese precoce em estirpes de *L. infantum*, poder estar associada a uma capacidade de disseminação do parasita e patogenicidade mais graves em estirpes viscerais do que em estirpes cutâneas. Esta particularidade poderá ter um impacto relevante no tropismo das estirpes híbridas, pois também estas revelaram uma metaciclogénese precoce em relação à estirpe de *L. major*. Relativamente às dinâmicas das estirpes híbridas, verificou-se que, a fase logarítmica (log) da híbrida IMT 208 foi similar à de *L. major* LEM 2164, enquanto a fase log da híbrida IMT 211 foi similar à *L. infantum* IMT 151. O número de parasitas no final da fase log foi idêntico entre as estirpes. Estes resultados vêm reforçar as similaridades entre estirpes híbridas com as putativas parentais já descritas em espécies do Novo Mundo (Cortes et al, 2012b).

À semelhança de estudos que demonstraram que uma população parasitária de *Leishmania* spp. é heterogênea, isto é, diferentes clones de uma mesma estirpe poderão ter comportamentos biológicos diferentes (Cortes et al, 2012b; Volf et al, 2007), seria relevante avaliar os padrões de crescimento de clones destas estirpes híbridas (e de outras) em relação a clones das putativas espécies parentais.

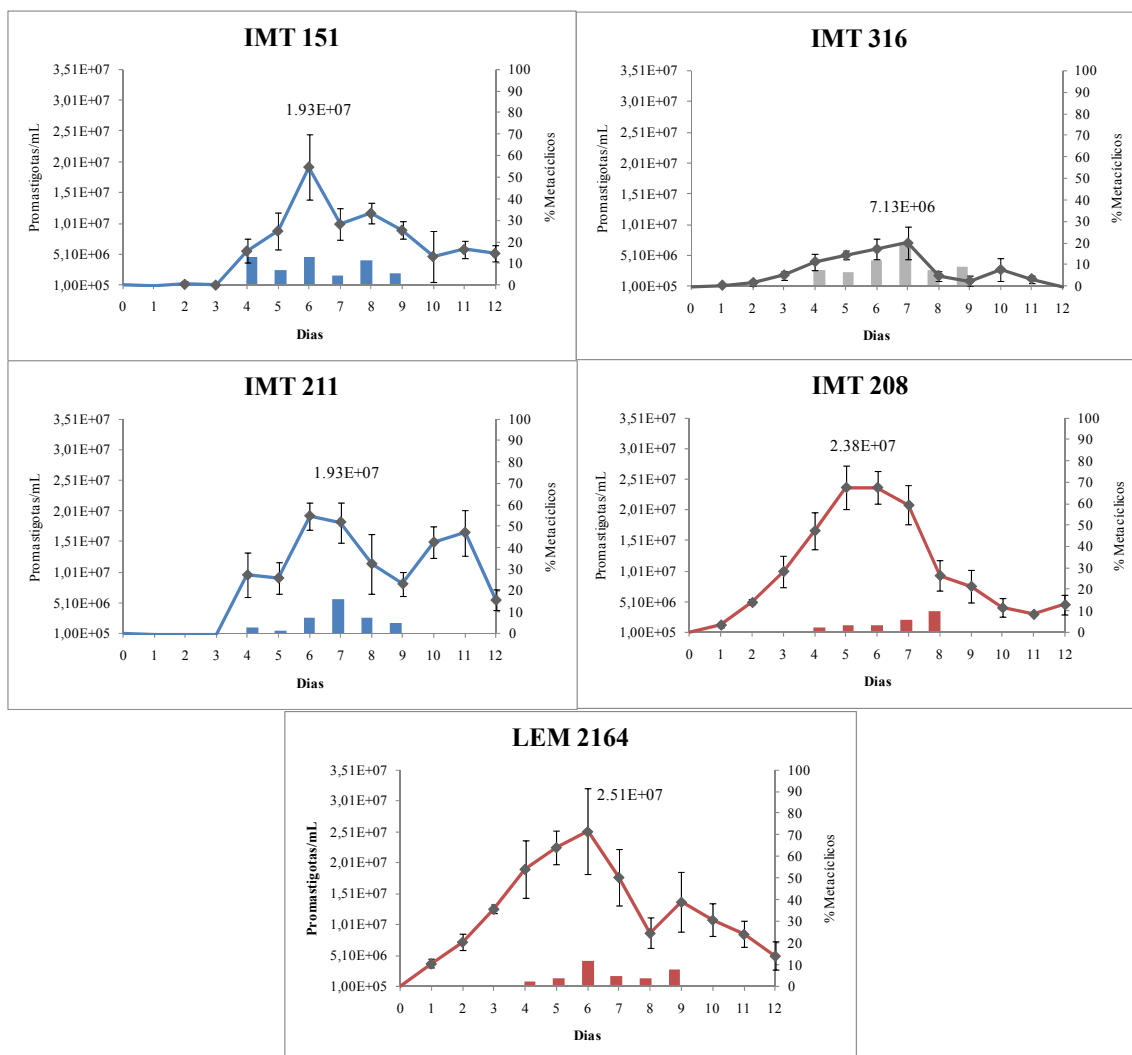


Figura 21 – Dinâmicas de crescimento das estirpes parentais *L. infantum* (IMT 151 e IMT 316), *L. major* (LEM 2164) e híbridas *L. infantum/L. major* (IMT 208 e IMT 211). Linhas, padrões de crescimento; colunas, percentagem de promastigotas metacíclicos. Resultados representam a média de quatro replicados e dois ensaios independentes; as barras de erro representam o desvio padrão.

Durante o ensaio do estudo dos padrões de crescimento, foi elaborada, em paralelo, uma análise morfológica. Esta consistiu na observação microscópica dos parasitas fixados e

corados e medição do comprimento do corpo celular das formas promastigotas para cada estirpe, nos dias 3, 6 e 9. O comprimento do corpo celular foi tratado como variável dependente, sendo a estirpe e o dia tratadas como variáveis independentes.

Na generalidade, observaram-se diferenças nos comprimentos dos corpos celulares de todas as estirpes e espécies em estudo (Figura 22), como previamente descrito por Bates (1994).

No dia 3, verificou-se que as estirpes de *L. infantum* (IMT 151 e IMT 316) apresentaram um comprimento médio das formas promastigotas entre os 9.74 μm e 10.20 μm , as estirpes híbridas (IMT 208 e IMT 211) com valores superiores, entre 12.27 μm e 12.39 μm , e os parasitas *L. major* (LEM 2164) com valor intermédio de 10.97 μm , respetivamente. Com $p=0.049$, verificou-se que houve apenas uma diferença estatisticamente significativa entre as estirpes *L. infantum* IMT 316 e híbrida IMT 208.

No dia 6, os parasitas das estirpes *L. infantum* mantiveram um comprimento médio menor (entre 11.06 μm e 10.21 μm) do que as híbridas e *L. major*. Neste dia, notaram-se mais diferenças estatisticamente significativas, nomeadamente a estirpe *L. infantum* IMT 316 relativamente às estirpes híbridas IMT 208 ($p=0.021$), IMT 211 ($p=0.003$) e *L. major* LEM 2164 ($p=0.007$).

No dia 9, observou-se um aumento do tamanho médio do comprimento dos promastigotas da estirpe híbrida IMT 211 com 15.62 μm , que foi significativamente diferente das estirpes IMT 316 ($p=0.000$), IMT 208 ($p=0.001$) e LEM 2164 ($p=0.005$).

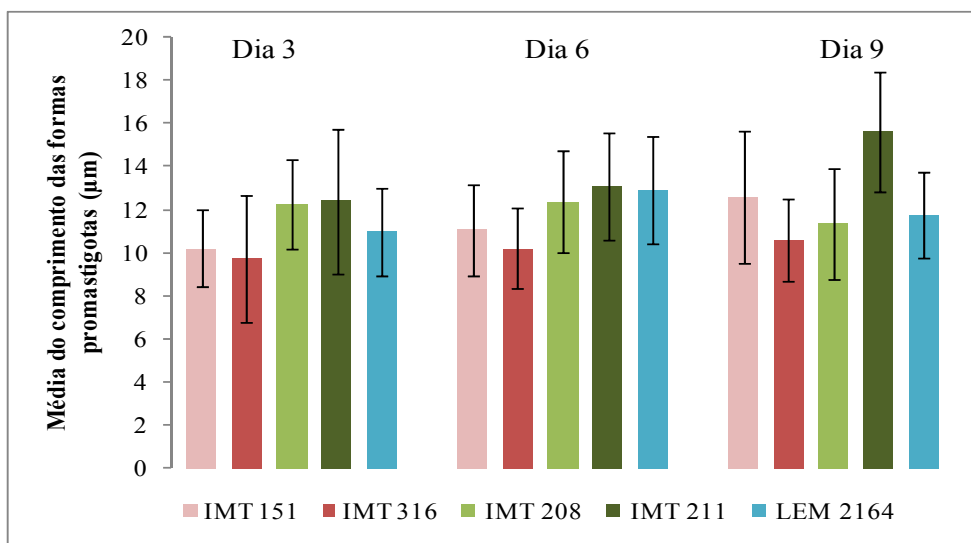


Figura 22 – Comprimento médio dos corpos celulares das estirpes parentais *L. infantum* (IMT 151 e IMT 316), *L. major* (LEM 2164) e híbridas *L. infantum/L. major* (IMT 208 e IMT 211) em condições normais de crescimento.

Os resultados representam a média de 20 replicados de um ensaio independente. As barras de erro, representam o desvio padrão.

De uma forma geral, a estirpe IMT 316, isolada de um caso de leishmaniose canina, apresenta um tamanho inferior aos das outras estirpes (isoladas de casos de leishmaniose humana) durante a sua dinâmica de crescimento normal. Apesar de não estar descrita a relação entre as dimensões do parasita e o tipo de hospedeiro vertebrado de que foi isolado, e tendo em conta o baixo número de estirpes testadas, este poderá ser um fato importante a analisar. A diferente proveniência das estirpes, poderá conferir-lhes determinadas características, como por exemplo ao nível de expressão de proteínas membranares, as quais estão mais relacionadas com fenómenos de endo e exocitose, responsáveis pela entrada/saída de espécies reativas de oxigénio (ROS) na célula. Desta forma, outros estudos fenotípicos e genotípicos deverão ser efetuados para avaliar se estas (e outras) estirpes poderão apresentar uma vantagem ou desvantagem seletiva na proliferação do parasita e disseminação da infeção no hospedeiro vertebrado.

Um maior número de estirpes e espécies provenientes de diferentes hospedeiros deveria ser incluído num estudo deste tipo, para esclarecer se o hospedeiro tem ou não um

impacto no comportamento biológico do parasita e consequentemente na sua infeciosidade noutros hospedeiros mamíferos.

2.1.2. Avaliação de “stress” oxidativo

Uma vez que a infeciosidade é acompanhada da habilidade para evadir ou resistir a efeitos microbicidas dos macrófagos, avaliou-se a toxicidade de H_2O_2 exógeno. Através da percentagem de viabilidade parasitária, determinou-se a concentração do composto que inibe 50 % dos parasitas (CI_{50}) (Figuras 23 e 24).

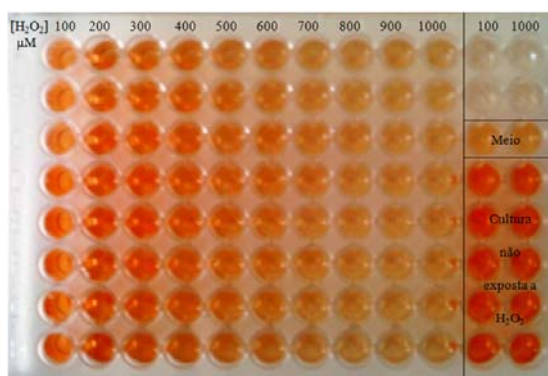


Figura 23 – Resultado de um ensaio com H_2O_2 revelado pelo método de XTT.

De uma forma geral, todos os parasitas das estirpes estudadas foram sensíveis à exposição de H_2O_2 , sendo que a sua viabilidade diminuiu com o aumento da concentração deste peróxido (Figura 24A). Também Wilson et al (1994), observaram em promastigotas de *L. infantum* do Novo Mundo, que existe uma perda de viabilidade dos parasitas, proporcional ao aumento de concentração de H_2O_2 .

Na concentração mais elevada de H_2O_2 (1000 μM), todas as estirpes demonstraram aproximadamente a mesma percentagem de viabilidade, ou seja, aproximadamente 50%.

Embora este estudo seja relativo a um número reduzido de espécies/estirpes de *Leishmania*, é de notar a plasticidade biológica das estirpes híbridas estudadas. Enquanto a estirpe híbrida IMT 211 demonstrou maior percentagem de viabilidade do que todas as outras estirpes, a estirpe híbrida IMT 208 apresentou os menores valores de

viabilidade. Os valores de CI_{50} encontrados refletem a suscetibilidade das diferentes estirpes ao H_2O_2 já observada nas curvas de viabilidade (Figura 24B).

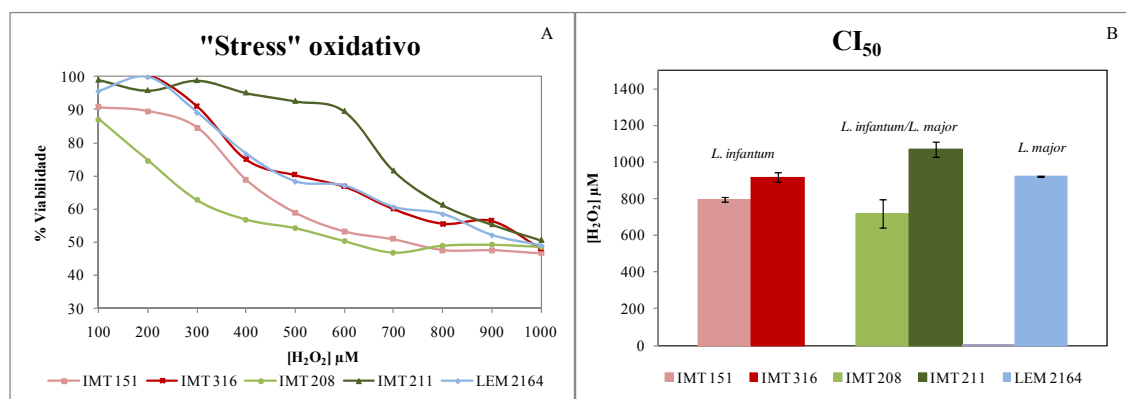


Figura 24 – Efeito do peróxido de hidrogénio nas estirpes de *L. infantum* (IMT 151 e IMT 316), *L. major* (LEM 2164) e híbridas *L. infantum/L. major* (IMT 208 e IMT 211). A) Curvas de viabilidade dos parasitas; B) Concentração inibitória para 50% dos parasitas em cultura (CI_{50}). Os resultados representam a média de oito replicados e três ensaios independentes. As barras de erro, representam o desvio padrão.

Particularmente, observou-se que a percentagem de viabilidade da estirpe híbrida IMT 208 foi significativamente diferente da percentagem de viabilidade da estirpe híbrida IMT 211 ($p=0.000$), assim como das putativas parentais IMT 316 ($p=0.011$) e LEM 2164 ($p=0.019$). Verificou-se ainda que a percentagem de viabilidade da estirpe putativa parental IMT 151 foi significativamente diferente da percentagem de viabilidade da IMT 316 ($p=0.047$) e da híbrida IMT 211 ($p=0.006$).

Apesar do comportamento diferenciado entre as estirpes híbridas *L. infantum/L. major* e as putativas parentais, Cortes et al (2012b), não observaram diferenças detetáveis no efeito leishmanicida de ROS, entre estirpes híbridas *L. braziliensis/L. peruviana* e as suas putativas parentais.

A elevada plasticidade demonstrada pelas estirpes híbridas estudadas, sugere que estas possam ter adquirido características genéticas conferentes de mecanismos de adaptação ambiental para evadir/resistir ao potencial efeito microbicida das células-alvo (macrófagos).

Como complemento a este estudo, seria interessante a análise da produção de óxido nítrico (NO) ou a expressão de sintetase de NO (iNOS) pelos macrófagos infectados com estas (e outras) estirpes/espécies, por exemplo em linhas celulares macrofágicas, permitindo obter mais informação relativamente à interação parasita-célula.

Quanto à estirpe *L. infantum* IMT 316, neste estudo verificaram-se algumas diferenças, comparativamente à outra estirpe *L. infantum* (IMT 151) estudada ($p=0.047$), e à estirpe híbrida IMT 208 ($p=0.011$). Tal como discutido na secção anterior, um maior número de estirpes/espécies provenientes de diferentes hospedeiros deveria ser incluído, para esclarecer o impacto do hospedeiro no comportamento biológico deste parasita.

2.1.3. Avaliação de “stress” nutricional

Estudou-se o comportamento biológico das estirpes estudadas em 2.1.2. sob o efeito de “stress” nutricional, avaliando-se a sua taxa de sobrevivência “in vitro”, com depleção de nutrientes do meio de cultura.

Sob o efeito de “stress” nutricional, observou-se uma homogeneidade de padrões de crescimento entre todas as estirpes, tendo as suas dinâmicas sido semelhantes às dinâmicas na ausência de “stress” (Figura 25). Por outro lado, verificou-se que, com a diminuição de nutrientes (menores concentrações de Schneider e, consequentemente maior percentagem de “stress”), os parasitas apresentaram um crescimento mais lento.

Para 0% e 25% de “stress” nutricional, as curvas padrão apresentam grande similaridade, sugerindo que a concentração de meio utilizado em laboratório, possa ser adaptado, no sentido de uma maior rentabilidade e poupança, sem comprometer a viabilidade e crescimento dos parasitas.

Ainda, na maioria dos casos, para 50% e 75% de “stress”, os parasitas tiveram um crescimento mais lento, atingindo tardiamente valores superiores de densidades parasitárias, comparativamente às verificadas em menores percentagens de “stress” nutricional.

Também, nesta experiência, se verificou um comportamento diferenciado entre a estirpe IMT 316 e as restantes, com menores densidades parasitárias, quando submetida a 50% e 75% de “stress”.

Quando submetidos a um “stress” nutricional de 99% e 100%, nenhuma das estirpes conseguiu multiplicar-se. Estudos semelhantes, efetuados por outros autores, com *Trypanosoma cruzi* - parasita protozoário geneticamente próximo de *Leishmania* -, descrevem a elevada plasticidade deste tripanosomatídeo a baixas concentrações de meio de cultura (Lewis et al, 2009). Este fato pode ser sugestivo da maior necessidade nutricional de *Leishmania* spp.

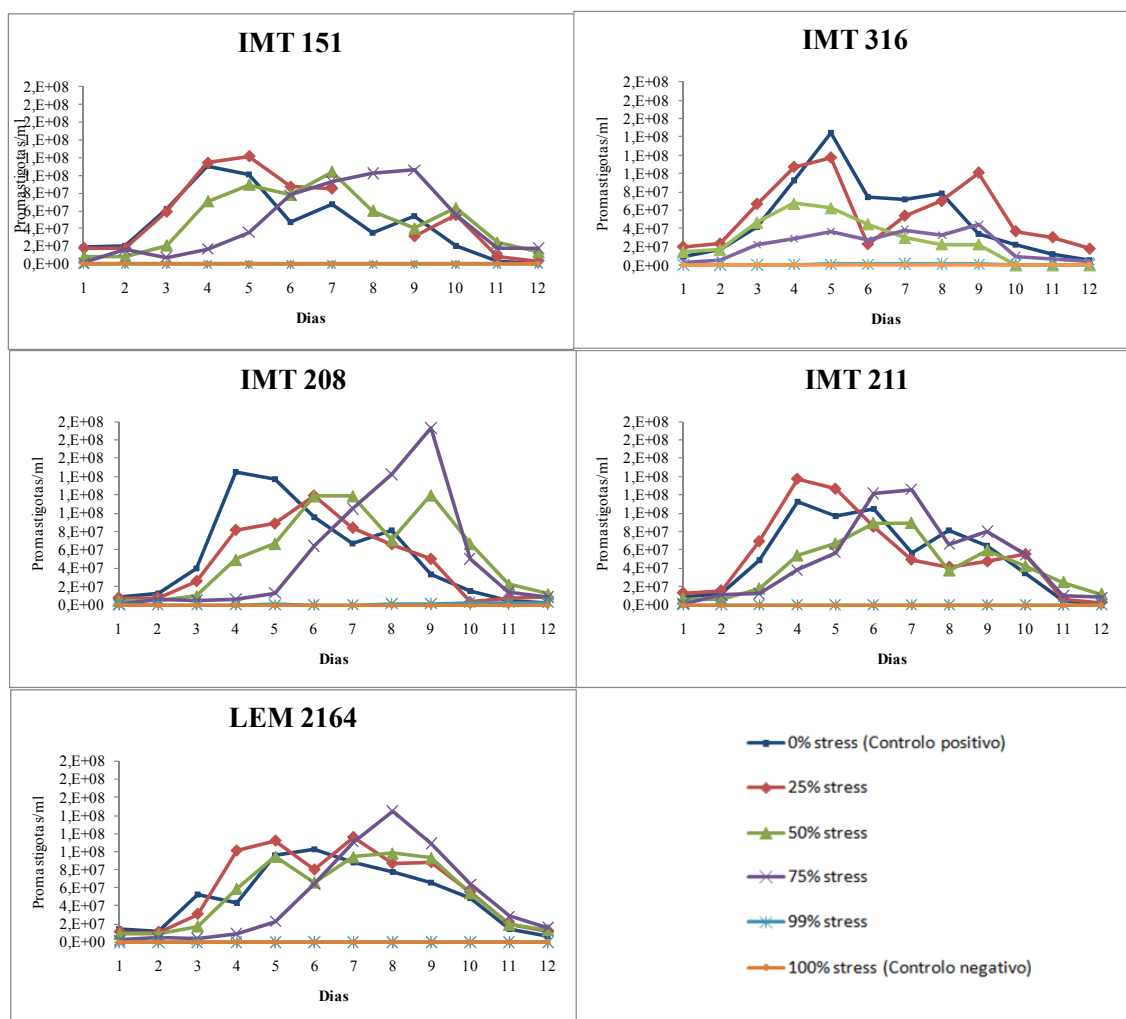


Figura 25 – Dinâmicas de crescimento das estirpes parentais *L. infantum* (IMT 151 e IMT 316), *L. major* (LEM 2164) e híbridas *L. infantum/L. major* (IMT 208 e IMT 211) sob condições de depleção de nutrientes do meio de cultura.

Os resultados representam a média de 4 replicados e 2 ensaios independentes.

Para complementar este estudo, seria interessante selecionar os parasitas previamente expostos a 50 e 75% de “stress” nutricional, visto que foram estes que apresentaram

maior resiliência. A utilização desses parasitas expostos a elevados níveis de “stress” para a infecção de macrófagos, permitiria avaliar a sua capacidade infecciosa. Seria ainda pertinente estudar o genótipo destes parasitas, avaliando a existência de potenciais alterações ao nível das sequências génicas.

Ainda, a realização deste ensaio com um maior número de estirpes, assim como a avaliação de determinados transportadores nutricionais específicos do parasita em diferentes condições de “stress”, poderia elucidar melhor as suas necessidades nutricionais e/ou plasticidade perante a falta de nutrientes essenciais.

2.1.4. Suscetibilidade “in vitro” de *Leishmania* spp. à Anfotericina B

2.1.4. 1. Avaliação da susceptibilidade dos parasitas

Determinou-se a suscetibilidade “in vitro” dos promastigotas de *Leishmania*, das estirpes *L. infantum*: IMT 151 e IMT 373; *L. major*: LEM 2164 e LV 561 e híbridas *L. infantum/L. major*: IMT 208 e IMT 211 ao fármaco de 1ª linha, na Europa, para o tratamento de LV, através da determinação da percentagem de viabilidade das estirpes e a concentração inibitória de 50% dos parasitas (CI₅₀) (Figuras 26 e 27).

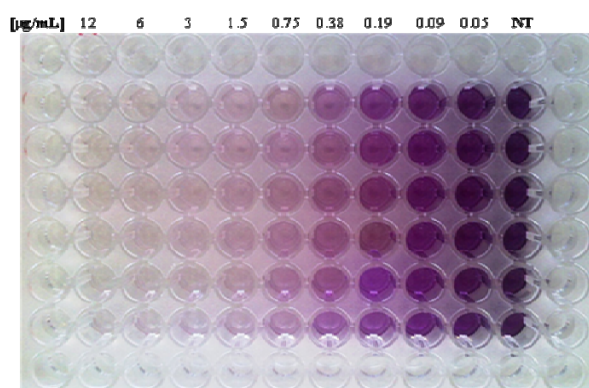


Figura 26 – Resultado de um ensaio de susceptibilidade com Anfotericina B revelado pelo método de MTT.

NT, Estirpe não tratada.

De uma forma geral, todas as estirpes foram suscetíveis à Anfotericina B (Figura 27, Tabela 13). Particularmente, verificou-se que as estirpes *L. infantum* (IMT 151 e IMT 373) apresentaram menor suscetibilidade ao fármaco do que as estirpes *L. major* (LV561 e LEM 2164). À semelhança do comportamento biológico intermédio observado em 2.1.1. e 2.1.2, entre as estirpes híbridas e as putativas parentais, quando expostos a Anfotericina B, as estirpes híbridas também apresentaram suscetibilidades intermédias relativamente às putativas parentais.

Para as estirpes de *L. infantum*, verificou-se que a IMT 151 apresentou menor suscetibilidade, com uma CI_{50} de 1.145 $\mu\text{g/mL}$, do que a IMT 373 com uma CI_{50} de 0.862 $\mu\text{g/mL}$. Num estudo recente, em que se avaliou a suscetibilidade de estirpes de *L. infantum* a outros fármacos, incluindo a Anfotericina B, observou-se maior suscetibilidade nas estirpes *L. infantum* do que em estirpes híbridas *L. infantum/L. major* (Maia et al, 2013).

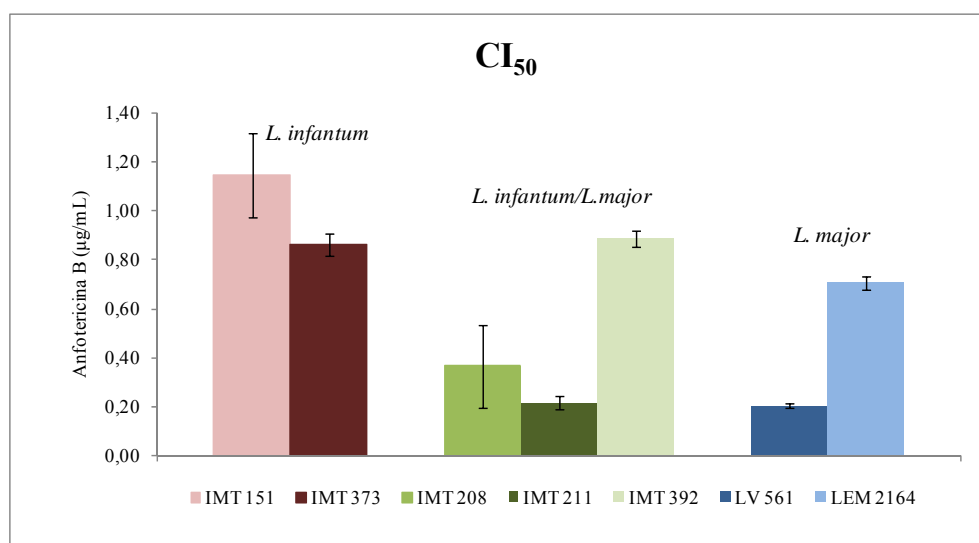


Figura 27 – Representação gráfica dos CI_{50} médios obtidos com as estirpes de *Leishmania* estudadas.

Resultados representam a média de seis replicados e 3 ensaios independentes. As barras de erro, representam o desvio padrão.

Tabela 13 – CI_{50} de Anfotericina B obtidas com as estirpes de *Leishmania* estudadas.

Espécie	Estirpe	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo de Confiança (95%) ($\mu\text{g/mL}$)	R^2
<i>L. major</i>	LEM 2164	0,706	0,631 - 0,790	0,900
	LV 561	0,206	0,180 - 0,235	0,900
<i>L.infantum/L.major</i>	IMT 208	0,366	- *	0,800
	IMT 211	0,216	0,160 - 0,290	0,900
	IMT 392	0,887	0,699 - 1,127	0,600
<i>L.infantum</i>	IMT 151	1,145	0,964 - 1,365	0,800
	IMT 373	0,862	0,584 - 1,289	0,900

CI , concentração inibitória; R^2 , coeficiente de regressão linear; *, não foi possível o cálculo.

Nas estirpes de *L. major*; a LEM 2164 apresentou menor suscetibilidade, do que a LV 561, com CI_{50} de 0.706 $\mu\text{g/mL}$ e 0.206 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente.

Relativamente às estirpes híbridas de *L. infantum/L. major*; estas apresentaram valores divergentes entre si, e intermédios comparativamente aos das putativas parentais, sendo que a IMT 392 apresentou a menor suscetibilidade, com um CI_{50} de 0.887 $\mu\text{g/mL}$, seguido da IMT 208 e da IMT 211 com CI_{50} de 0.366 $\mu\text{g/mL}$ e 0.216 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente.

O comportamento intermédio entre as estirpes híbridas e as suas putativas parentais aqui observado, foi já descrito por outros autores, em estirpes híbridas do Novo Mundo (Cortes et al, 2012b).

Na generalidade, observou-se ainda, que as estirpes com um maior número de passagens (IMT 373, IMT 392 e LEM 2164), apresentaram menores suscetibilidades, comparativamente às estirpes com menor número de passagens (IMT 208, IMT 211 e LV561). Moreira et al (2012), sugerem que o elevado número de passagens em cultura, poderão contribuir para a aquisição de mecanismos de adaptação ao fármaco. Por outro lado, a estirpe *L. infantum* IMT 151, apesar de ter um baixo número de passagens, apresentou o maior CI_{50} . Para entender melhor o impacto da cultura axénica

contínua, na suscetibilidade dos parasitas a diferentes fármacos, um maior número de estirpes/espécies, com diferentes números de passagens, deveriam ser estudadas.

Como complemento a este estudo, a determinação da concentração inibitória em parasitas de *Leishmania* na forma amastigota, quer num sistema “macrófagos/amastigotas”, quer num sistema “amastigotas axénicos”, seria crucial, visto que é um modelo mais aproximado da realidade, já que este fármaco é utilizado para o tratamento de leishmaniose no hospedeiro vertebrado e neste só se encontram as formas amastigotas (Rycker et al, 2013; Croft e Coombs, 2003).

2.1.4.2. Avaliação da citotoxicidade e do índice de seletividade

Para avaliação da seletividade do fármaco AnfB aos parasitas, realizou-se um ensaio de citotoxicidade, para a linha celular RAW 264.7, tendo-se obtido 29.987 µg/mL de dose letal que mata 50% das células (DL₅₀). Posteriormente determinaram-se os índices de seletividade (IS) para cada estirpe. Todas as estirpes apresentaram IS>20 µg/mL (Tabela 14), corroborando a utilização deste, como um bom fármaco para o tratamento da leishmaniose (Nwaka e Hudson, 2006).

Tabela 14 – Índices de seletividade de Anfotericina B das estirpes de *Leishmania*.

Espécie	Estirpe	IS
<i>L. major</i>	LEM 2164	42,475
	LV 561	145,568
<i>L. infantum/L. major</i>	IMT 208	81,932
	IMT 211	138,829
	IMT 392	33,807
<i>L. infantum</i>	IMT 151	26,190
	IMT 373	34,788

IS, Índice de seletividade.

Diversos fatores poderão estar envolvidos nas diferenças de suscetibilidade dos parasitas das diferentes estirpes/espécies a este fármaco. Segundo Croft (2001), a

variação de sensibilidade à Anfotericina B, deve-se aos diferentes tipos e quantidades de esteróis existentes na membrana do parasita, visto que é o principal alvo do fármaco.

2.2. Ensaios “in vitro” com amastigotas de *Leishmania*

Para avaliar a infeciosidade “in vitro” das estirpes de *Leishmania* utilizadas em **1.4.**, infetaram-se duas linhas celulares, U-937 e RAW 264.7 e determinaram-se as respectivas taxas e intensidades de infecção.

2.2.1. Diferenciação de linhas celulares

Uma vez que as linhas celulares utilizadas não são diferenciadas em macrófagos, otimizou-se o tempo necessário para a sua diferenciação, através de observação qualitativa das células diferenciadas após 24, 48 e 72 horas de exposição a PMA (“phorbol myristic acid”).

Relativamente à linha celular U-937, observou-se uma densidade celular semelhante nos três períodos de incubação testados, na ausência e na presença de PMA (Figura 28). Quanto à qualidade da diferenciação, após 24 horas de incubação, observaram-se vários monócitos diferenciados em macrófagos, mas ainda alguns monócitos. Após 48 e 72 horas de incubação, na presença de PMA, observou-se uma maior quantidade de macrófagos.

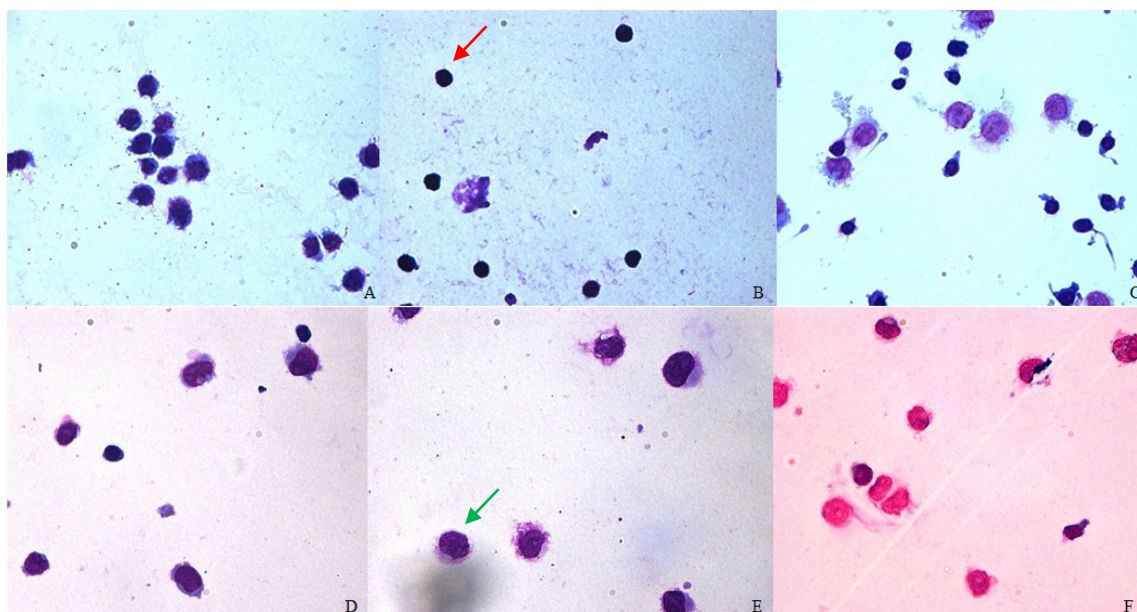


Figura 28 – Tempos de incubação para otimização de diferenciação da linha celular U-937.

A, 24 horas sem PMA; B, 48 horas sem PMA; C, 72 horas sem PMA; D, 24 horas com PMA; E, 48 horas com PMA; F, 72 horas com PMA. Seta encarnada, Monócito; Seta verde, Macrófago (A=400x).

Relativamente à linha celular RAW 264.7 (Figura 29), verificou-se uma maior diferença entre os três tempos de incubação, quer na quantidade de células diferenciadas em macrófagos, quer na densidade celular. Nas células não expostas a PMA, a densidade celular aumentou com o aumento do tempo de incubação, revelando sempre uma mistura de vários monócitos e alguns macrófagos. Nas células expostas a PMA, após 24 horas de exposição, verificaram-se também vários monócitos e alguns macrófagos. Após 48 horas de exposição, observou-se uma maioria de células diferenciadas em macrófagos, enquanto às 72 horas de exposição, se verificaram diversos aglomerados celulares.

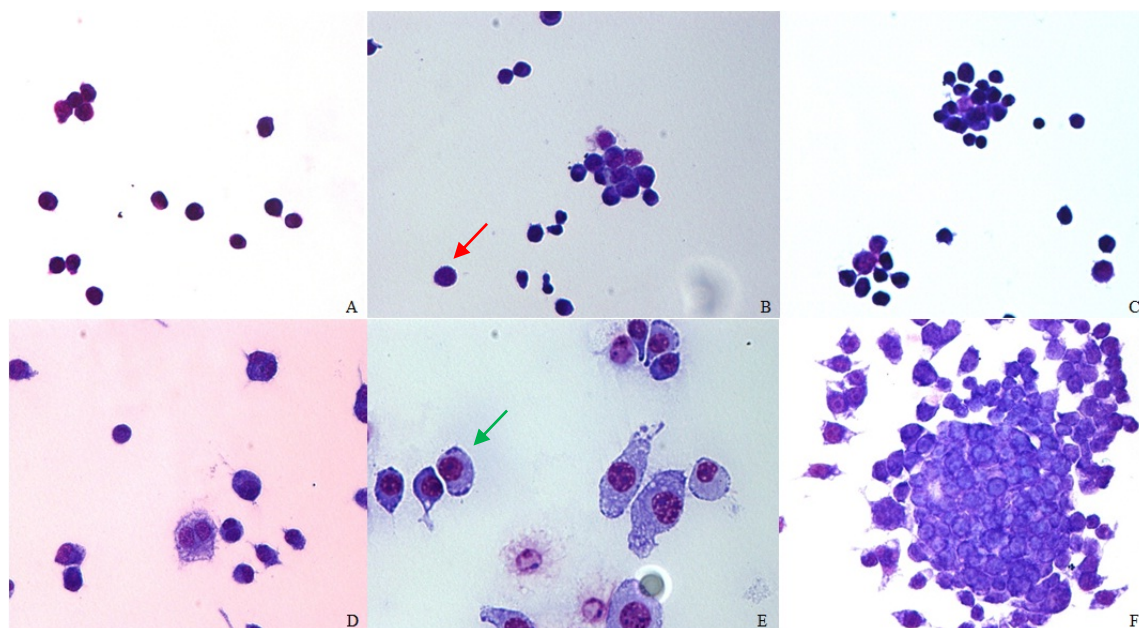


Figura 29 – Tempos de incubação para otimização de diferenciação da linha celular RAW 264.7.

A, 24 horas sem PMA; B, 48 horas sem PMA; C, 72 horas sem PMA; D, 24 horas com PMA; E, 48 horas com PMA; F, 72 horas com PMA. Seta encarnada, Monócito; Seta verde, Macrófago (A=400x).

De acordo com os resultados obtidos para as duas linhas celulares, e atendendo à necessidade de se obter maior quantidade de macrófagos para uma infecção com sucesso, e uma boa dispersão celular, permitindo a contagem das células por microscopia, considerou-se como tempo ótimo para a diferenciação celular as 48 horas.

2.2.2. Infecção de linhas celulares

Estudos anteriores mostraram que a linha celular U-937, se revelou como modelo adequado para estudos de suscetibilidade a fármacos anti-*Leishmania* (Maia et al, 2013). Relativamente à linha celular RAW 264.7 esta é, até à data de execução deste trabalho, a primeira descrição da sua utilização em estudos “in vitro” de infecção por *Leishmania* spp., embora já estejam descritos ensaios de citotoxicidade associados a estudos de susceptibilidade em *Leishmania* spp. (Mallick et al, 2013; Gour et al, 2012; Rondon et al, 2012; Wong et al 2012).

De um modo geral, observaram-se diferenças nas taxas de infecção entre as duas linhas celulares, independentemente da espécie ou estirpe utilizada. A taxa de infecção observada na linha celular U-937 foi superior, com uma média de 45,71% de macrófagos infectados, sendo o valor máximo observado de 58% (Figura 30). Na linha celular RAW 264.7 observou-se uma menor taxa de infecção com uma média de 32,57% macrófagos infectados e um valor máximo de 44%. Na generalidade, estas diferenças não se mostraram significativas ($p < 0.05$), à excepção da estirpe LV 561 que apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre a linha celular RAW 264.7 e a linha celular U-937 ($p = 0.001$).

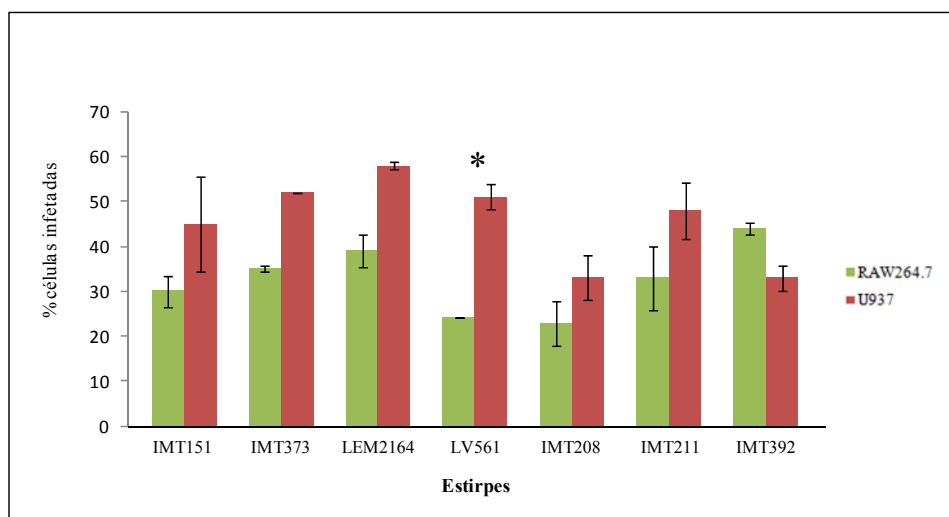


Figura 30 – Taxas de infecção das diferentes estirpes de *Leishmania*, nas linhas celulares RAW 264.7 e U-937.

*($p = 0.001$). Os resultados representam a média de duas contagens e um ensaio independente. As barras de erro representam o desvio padrão.

Independentemente da linha celular, as taxas de infecção das diferentes estirpes não foram estatisticamente significativas ($p < 0.005$).

No que respeita a intensidade de infecção, observou-se uma relação proporcional comparativamente às taxas de infecção entre linhas celulares, ou seja, na generalidade, todas as estirpes se revelaram mais infecciosas para a linha celular U-937 comparativamente à linha celular RAW 264.7.

De uma forma geral, obteve-se uma maior intensidade de infecção na linha celular U-937 em relação à RAW 264.7 (Figura 31 a 33, Tabela 15). Em particular, destacam-se as elevadas taxas de infecção da estirpe *L. infantum* IMT 373, seguidas de *L. major* LEM 2164 e *L. infantum* IMT 151, as híbridas IMT 211 e IMT 392. As menores intensidades de infecção observadas foram nas estirpes *L. major* LV 561 e híbrida IMT 208.

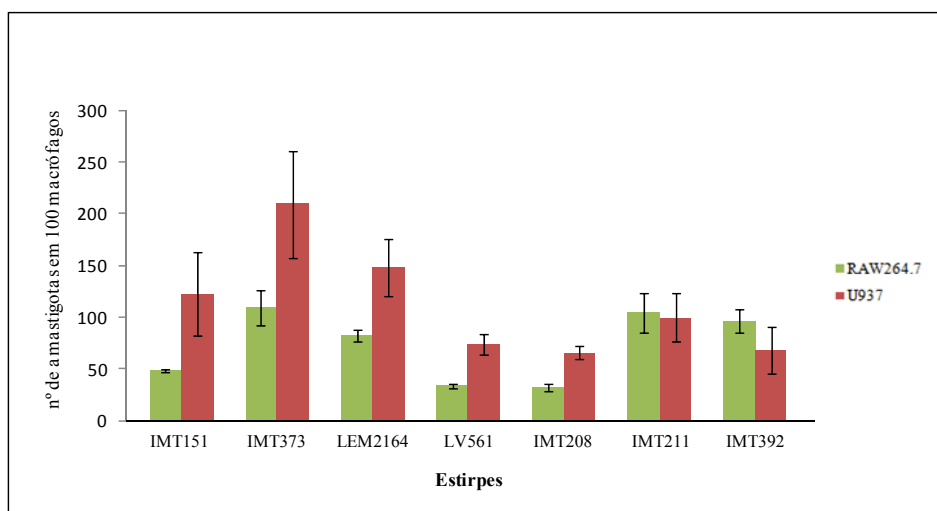


Figura 31 – Intensidades de infecção das diferentes estirpes de *Leishmania*, nas linhas celulares RAW 264.7 e U-937.

Os resultados representam a média de duas contagens e um ensaio independente. As barras de erro representam o desvio padrão.

Tabela 15 – Intensidades de infecção das diferentes estirpes de *Leishmania*.

Espécie	Estirpe	Nº amastigotas/100 macrófagos infectados	
		U-937	RAW 264.7
<i>L. infantum</i>	IMT 151	123	48
	IMT 373	209	109
<i>L. major</i>	LEM 2164	149	82
	LV 561	74	34
<i>L. infantum/ L. major</i>	IMT 208	66	33
	IMT 211	100	105
	IMT 392	68	96

O comportamento das estirpes híbridas aqui demonstrado, por um lado intermédio relativamente às putativas estirpes parentais e por outro lado divergente entre si, entra em concordância com os ensaios “in vitro” descritos nos pontos anteriores assim como

com outros estudos “in vitro” e “in vivo” realizados com estirpes parentais e híbridas do Novo Mundo (Cortes et al, 2012b).

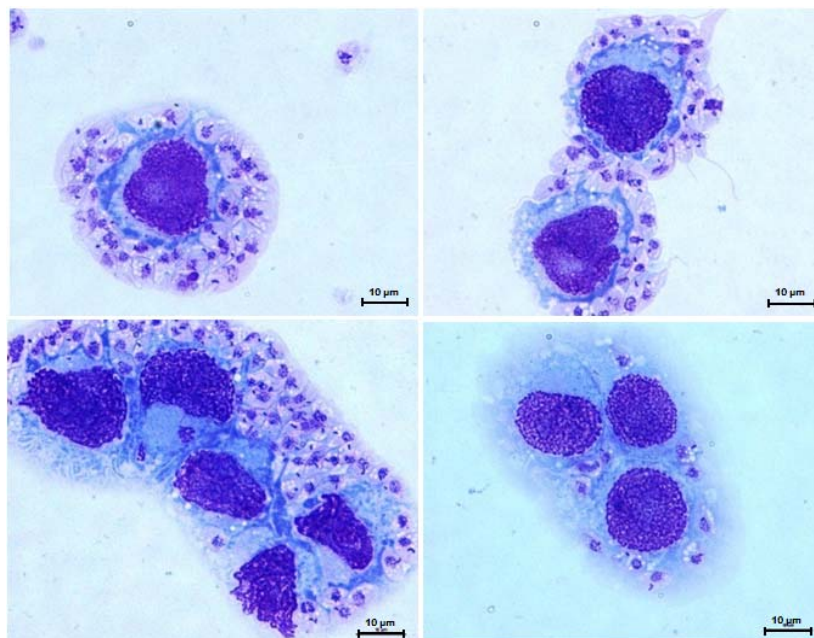


Figura 32 – Macrófagos diferenciados da linha celular U-937, infectados com *Leishmania* spp. (A=1000x).

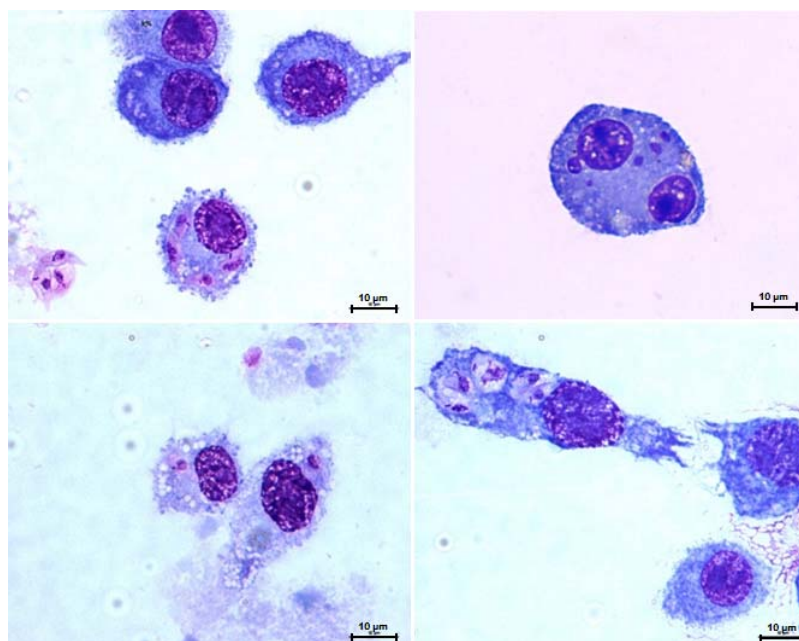


Figura 33 – Macrófagos diferenciados da linha celular RAW 264.7, infectados com *Leishmania* spp. (A=1000x).

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES

Leishmania infantum e *L. major* são espécies de *Leishmania* do Velho Mundo, responsáveis por leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose cutânea (LC) zoonótica, respetivamente.

Na Bacia mediterrânica *L. infantum* é o agente etiológico causador de leishmaniose canina, LV e, menos frequentemente, de LC. Até à data não foram identificados casos autóctones de LC devidos a *L. major* em Portugal. Porém, ao contrário da LV, a LC não é uma doença de declaração obrigatória, estimando-se que diversos casos sejam subnotificados ou até mal diagnosticados (Campino et al, 2012).

Apesar de serem filogeneticamente e epidemiologicamente distantes, foram recentemente identificadas, em Portugal, estirpes híbridas naturais de *L. infantum/L. major*, as quais foram já estudadas relativamente ao seu potencial de transmissão (Volf et al, 2007; Ravel et al, 2006). Alguns autores debatem, no entanto, a existência das estirpes híbridas naturais *L. infantum/L. major* portuguesas devido à inexistência, até então, de *L. major* no país (Hamad, 2011). Contudo, recentemente foi identificado, na região do Algarve DNA de *L. major* num “espécimen” de *Sergentomyia minuta* (Campino et al, 2013). Foi ainda identificado neste país, um caso de LC importado, numa criança de seis anos do sexo feminino, que tinha viajado à Tunísia nos meses precedentes. Após diagnóstico molecular da biópsia de pele proveniente de uma das lesões cutâneas, foi identificado DNA de *L. major* (Faleiro et al, 2012). Estas descobertas levantam a hipótese da circulação de *L. major* em Portugal e questionam o papel de *S. minuta* na epidemiologia de *Leishmania* sp.

Embora seja considerado um evento raro, a recombinação génica em *Leishmania* é já um evento reconhecido por diversos autores (Akopyants et al, 2009; Miles et al, 2009). O fato dos parasitas *Leishmania* poderem sofrer recombinação genética, é de grande importância epidemiológica. Em condições de “stress”, as trocas genéticas poderão ser cruciais para a sua sobrevivência e expansão. A hibridação pode permitir a adaptação dos parasitas a novos climas, nichos ecológicos, vetores, e hospedeiros, incluindo humanos e animais domésticos, assim como a dispersão eficaz de novas características biológicas, com potenciais implicações na epidemiologia, resposta a tratamento e, consequentemente, controlo da doença (Miles et al 2009).

Neste estudo, procedeu-se à pesquisa de novos isolados de *Leishmania* numa região endémica de Portugal, com objetivo de identificação de “novas espécies” híbridas e à análise do comportamento “in vitro” de estirpes de *L. infantum* portuguesas, de *L. major* e das estirpes híbridas *L. infantum/L. major* encontradas no nosso país. Apesar de não se ter identificado DNA de “novas espécies” híbridas, encontrou-se uma elevada prevalência (45.85%) na região endémica onde se efetuou o estudo.

Os resultados obtidos, permitiram um melhor esclarecimento do comportamento biológico destas estirpes híbridas naturais de *L. infantum/L. major* (IMT 208, IMT 211 e IMT 392), tendo as mesmas demonstrado um comportamento e infeciosidade “in vitro” intermédios, relativamente às putativas estirpes parentais, *L. infantum* (IMT 151, IMT 373 e IMT 316) e *L. major* (LV561 e LEM 2164).

Como complemento a este estudo, seria pertinente a inclusão de mais estirpes híbridas e parentais. Seria ainda interessante o estudo “in vivo” em modelo murino, avaliando por um lado, as manifestações clínicas e patogenicidade no hospedeiro, com as estirpes híbridas e putativas parentais e, por outro, a respetiva resposta imunológica resultante da infeção. Será igualmente importante efectuar uma análise genotípica das diferentes estirpes, e assim possibilitar uma caracterização mais exaustiva das mesmas. Estes resultados poderão também servir de base para o desenvolvimento de outros estudos com estas “novas espécies”, relacionados com o papel de biomarcadores de virulência já conhecidos, assim como a identificação e caracterização de novos biomarcadores de patogenicidade, que permitam um potencial prognóstico do tipo de infeção e avaliação do seu risco epidemiológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bibliografia elaborada de acordo com o Sistema Harvard

ABRANCHES, P. e PIRES, C. (1980) O Kala-Azar em Portugal. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, vol.no. 3(3), pp. 203-217.

ABRANCHES, P. et al (1993) Epidemiology of leishmaniasis in Portugal. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, vol.no.70, pp. 349-355.

ABRANCHES, P. et al. (1986) La leishmaniose viscerale dans la region de Lisbonne. Identification enzymatique. Interpretation structurale du foyer. In: *Leishmania. Taxonomie et Phylogenese. Applications eco-epidemiologiques*, RIOUX, J.A. (ed.), *Institut Mediterranee d'Estudes Epidemiologiques*. Montpellier, pp. 427.

ADLER, S. e BER, M. (1941) The transmission of *Leishmania tropica* by the bite of *Phlebotomus papatasi*, *Indian Journal of Medical Research*, vol. no. 29. pp. 803–809.

AKOPYANTS, N.S. et al. (2009) Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector, *Science*, vol.no. 324(5924), pp. 265-268.

ALAM, M.S. et al. (2011) Survey of domestic cattle for anti-*Leishmania* antibodies and *Leishmania* DNA in visceral leishmaniasis endemic area of Bangladesh. *BMC Veterinary Research*, vol.no. 7, pp. 27.

ALVAR, J. et al. (2004) Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, vol.no.57, pp. 1-88.

ALVAR, J. et al. (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence, *PLoS ONE*, vol. no. 7(5), e35671.

ALVARES, D. (1910) Um caso de Kala-Azar infantil em Lisboa. *A Medicina Contemporanea*, vol.no. 20(12), pp. 90-91.

ALVARES, D. e SILVA, E. (1911) Sobre a frequência do Kala-Azar nos cães em Lisboa. *Sociedade das ciencias medicas de Lisboa*, vol.no.13.

AMAZON (2013) Lab & Scientific Products [www] Amazon Supply. Available from: <http://www.amazonsupply.com/nunc-lab-tek-chambered-borosilicate-0-2-0-5ml/dp/B008OY36VO> [Accessed 10/08/13]

ANDERS, G. et al. (2002) Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA-specific primers. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(S1), pp. S87-92.

ANDRADE, H. et al. (2002) *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Veterinary Parasitology*, vol.no. 103, pp. 71–81.

ASHFORD, D.A. et al. (1995) Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.no.53, pp. 251-255.

AZEVEDO, J.F. (1960) Sobre o diagnóstico do Kala-Azar. *Jornal do Médico*, vol.no.43, pp. 265-272.

BALANÑA-FOUCE, R. et al. (1998) The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology*, vol.no. 30(4), pp. 435-443.

BANETH, G. et al. (2008) Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, vol.no. 24, pp. 324-330.

BAÑULS, A.L. (1993) *Analyse génétique d'isolats naturels sud-américains de Leishmania montrant de possibles phénomènes de recombinaison*, tese DEA, Université de Montpellier II.

BAÑULS, A.L. et al. (1999) Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. *International Journal for Parasitology*, vol.no. 29, pp. 1137-1147.

BAÑULS, A.L. et al. (2007) *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, vol.no. 64, pp. 1-109.

- BATES, P.A. (1994) The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. *Experimental parasitology*. Vol.no. 79(2), 215-218.
- BEACH, D.H. et al. (1988) Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol.no.31, pp. 149-162.
- BEAVER, P.C. et al. (1984) Clinical Parasitology. LEA e FEBIGER eds.), 9ª ed., Philadelphia, USA, vol.no. 35, pp. 722-731.
- BELLI, A.A. et al. (1994) A putative *Leishmania panamensis/Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology*, vol.no. 109, pp. 435-442.
- BERMAN, J.D. (1988) Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Reviews of Infectious Diseases*, vol.no. 10, pp. 560-586.
- BERMAN, J.D. et al. (1985) Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol.no. 27, pp. 916-920.
- BERMAN, J.D. et al. (1987) Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania* amastigotes. *Biochemistry & Pharmacology*, vol.no.36, pp. 197-201.
- BHATTARAI, N.R. et al. (2010) Domestic Animals and Epidemiology of Visceral Leishmaniasis, Nepal. *Emerging Infectious Diseases*, vol.no. 6(2) , pp. 231-237.
- BLACKBURN, K. et al. (1988) The peritrophic membrane of the female sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol.no 82, pp. 613-619.
- BOGDAN, C. et al. (1990) Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of

- Leishmania major* amastigotes. *European Journal of Immunology*, vol.no. 20, pp. 1131-1135.
- BOGITSH, B.J. e CHENG, T.C. (1998). Human Parasitology. In: Academic Press. 2^a Ed. San Diego, pp. 95-112.
- BRAY, P.G. et al. (2003) Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past present and future. *Trends in Parasitology*, vol.no. 19, pp. 232-239.
- BRAY, R.S. (1982) The zoonotic potencial of reservoirs of leishmaniasis in the Old World. *Ecology of Disease*, vol.no. 1, pp. 257-267.
- CABRAL, M. et al. (1998) The immunology of leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, vol.no. 76, pp. 173-180.
- CALVOPINA, M. et al. (2006) Relapse of new world diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana* after miltefosine treatment. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol.no. 75(6), pp. 1074-1077.
- CAMPINO, L. (1998) *Leishmanioses em Portugal. Características emergentes da epidemiologia e do diagnóstico*. Tese de doutoramento. Universidade Nova de Lisboa, pp. 192.
- CAMPINO, L. (2002) *Canine reservoirs and leishmaniasis: epidemiology and disease*. In: FARREL, J.P. (ed.), *World Class Parasites Leishmania*, vol. 4. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrech, London, pp. 45-57.
- CAMPINO, L. e ABRANCHES, P. (2001) Leishmaniose Cutânea. Uma doença rara em Portugal? *Acta Médica Portuguesa*, vol.no. 14, pp. 33-42.
- CAMPINO, L. e MAIA, C. (2010) Epidemiologia das Leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, vol.no.23, pp. 859-864.

- CAMPINO, L. e MAIA, C. (2012) *The Role of Reservoirs: Canine Leishmaniasis*. In: Drug Resistance in Leishmania Parasites. PONTE-SUCRE, A. et al. (eds.), Springer-Verlag, Wien, pp.45-64.
- CAMPINO, L. et al. (1994) The isolation of *Leishmania donovani* MON-18, from an AIDS patient in Portugal: possible needle transmission. *Parasite*, vol.no. 1, pp. 391-392.
- CAMPINO, L. et al. (1997) HIV/*Leishmania* co-infections in Portugal: diagnosis and isoenzyme characterization of *Leishmania*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol.no. 91, pp. 433-436.
- CAMPINO, L. et al. (2006) Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health*, vol.no. 11(11), pp. 1708-1714.
- CAMPINO, L. et al. (2012) Leishmaniose: doença negligenciada da pobreza e emergente no *Mare Nostrum* – oito décadas de contributo do IHMT. *Anais do IHMT, Edição Comemorativa*, pp. 57-59.
- CARDOSO, L. et al. (2004) Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Tropica*. Vol.no. 91(2), pp. 95-100.
- CARDOSO, L. (1998) *Aplicação do teste intradérmico na leishmaniose canina: detecção de portadores assintomáticos*. Dissertação de mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- CASTAGNA, M. et al. (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of biological chemistry*, vol.no. 257, pp. 7847-7851.
- CHANG, K.P. et al. (2003) *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Tropica*, vol.no. 85(3), pp. 375-390.

- CHAPPUIS, F. et al. (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, vol.no. 5, pp.873-882.
- COOK, G.C. (1993) Leishmaniasis: some recent developments in chemotherapy. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol.no. 31, pp.327-330.
- CORTES, C. et al. (2006) Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitology International*, vol.no. 55, pp. 277-283.
- CORTES, S. et al. (2004) PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s. l.-specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.no. 98, pp. 12-17.
- CORTES, S. et al. (2012a) Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, vol.no. 189(2-4), pp.189-196.
- CORTES, S. et al. (2012b) *In vitro* and *in vivo* behaviour of sympatric *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *L. (V.) peruviana* and their hybrids. *Parasitology*, vol.no. 139, pp. 191-199.
- COX, F.E.G. (2002) History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. no. 15(4), pp. 595–612.
- CROFT, A.L. et al. (2006) Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, vol.no. 19 (1), pp. 111-126.
- CROFT, S.L. (2001) Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health*, vol.no. 6(11), pp. 899-905.
- CROFT, S.L. e COOMBS, G.H. (2003) Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, vol.no. 19(11), pp. 502-508.
- CROFT, S.L. e YARDLEY, V. (2002) Chemotherapy of leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design*, vol.no. 8, pp. 319-342.

- CUERVO, P. et al. (2010) Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of Proteomics*, vol.no.73, pp. 848.
- CUPOLILLO, E. et al. (2003) Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, vol.no. 41(7), pp. 3126-32.
- DARCE, M. et al. (1991) Etiology of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.no.85(1), pp. 58-59.
- DEDET, J.P. e PRATLONG, F. (2003) Manson's Tropical Diseases. COOK, G.C. e ZUMLA, A. (eds.). Saunders, 22^a ed., London, pp. 1339-1364.
- DELGADO, O. et al. (1997) Cutaneous leishmaniasis in Venezuela caused by infection with a new hybrid between *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (v.) guyanensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol.no. 92, pp. 581-582.
- DERMAAMIN (n.d.) Cutaneous leishmaniasis [WWW] The best for dermatologist. Available from: <http://www.dermaamin.com/site/atlas-of-dermatology/3-c/318-cutaneous-leishmaniasis-.html> [Accessed 10/08/13]
- DESJARDINS, M. e DESCOTEAUX, A. (1997) Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine*, vol.no. 185, pp. 2061-2068.
- DESJEUX, P. (1992) Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects, *World Health Statistics Quarterly*, vol. no.45, pp. 267-275.
- DESJEUX, P. (1999) Global control and *Leishmania*/HIV co-infection, *Clinics in Dermatology*, vol. no. 17. pp. 317-25.
- DESPLAZES, P. et al. (1995) Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunology*, vol.no. 17, pp. 451-458.

- DUJARDIN, J.C. et al. (1995) Putative *Leishmania* hybrids in Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Tropica*, vol.no. 59, pp. 293-307.
- DUMAS, C. et al. (1997) Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *The EMBO Journal*, vol.no. 16(10), pp. 2590-2598.
- EVANS, D. (1989) *Handbook on Isolation Characterization And Cryopreservation of Leishmania*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 45.
- EVANS, D. et al. (1987) Hybrid formation within the genus *Leishmania*? *Parassitologia*, vol.no. 29(2-3), pp. 165-173.
- FALEIRO, J. et al. (2012) Úlcera cutânea após viagem à Tunísia. *Acta Pediátrica Portuguesa*, vol.no. 43(3), pp. 135-136.
- FARRELL, J. P. (2002) World Class Parasites. SAMUEL, J.B. e SEED, J.R., (eds.). *Kluwer Academic Publishers*, pp. 45-57
- FERREIRA, A. et al. (2008). Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, vol.no. 152, pp. 257-263.
- FERROGLIO, E. et al. (2006) Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.no. 100(7), pp. 636-641.
- FISA, R. et al. (2001) Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Veterinary Parasitology*, vol.no. 83, pp. 87-97.
- GAUNT, M.W. et al. (2003) Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*, vol.no. 421, pp. 936-939.
- GIBSON, W. et al. (2008) The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. *Parasites and Vectors*, vol.no. 1(4), pp. 1-15.

GOUR, J.K. et al. (2012) Identification of Th1-responsive leishmanial excretory-secretory antigens (LESAs). *Experimental Parasitology*, vol.no. 132, pp. 355-361.

GRAMICCIA, M. et al. (1991) A *Leishmania infantum* enzymatic variant, causative agent of cutaneous leishmaniasis in north Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.no. 85, pp. 370-371.

GRAMICIA, M. et al. (1992) Two syntopic zymodemes of *Leishmania infantum* cause human and canine visceral leishmaniasis in the Naples area, Italy. *Acta Tropica*, vol.no.50, pp. 357-359.

GRIMALDI, J.G. e TESH, R.B. (1993) Leishmaniasis of the new world: Current conceptions and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews*, vol.no. 6(3), pp. 230-250.

GRIMM, F. et al. (1991) Promastigote infectivity in *Leishmania infantum*. *Parasitology research*, vol.no. 77, pp. 185-191.

GUARGA, J.L. et al. (2000) Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. *Acta Tropica*, vol.no. 77, pp. 203–207.

HAMAD, S.H. et al. (2011) *Leishmania*: Probable genetic hybrids between species in Sudanese isolates. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, vol.no. 3(6), pp. 142-145.

HAMIDI, A.N. et al. (1982) Visceral leishmaniasis of jackals and dogs in northern Iran. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.no. 76, pp. 756-757.

HARITH, A. et al. (1989) Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *Journal of Clinical Microbiology*, vol.no. 27, pp. 2252-2257.

HIDE, M. e BANULS, A.L. (2006) Species-specific PCR assay for *L. infantum*/*L. donovani* discrimination. *Acta Tropica*, vol.no. 100(3), pp. 241-245.

HOWARD, M.K. et al. (1987) *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation in vitro, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. *Experimental Parasitology*, vol.no. 64(2), pp. 147-156.

IDRC (n.d.) [WWW] International Development Research Center. Available from: www.idrc.ca [Accessed 25/12/11]

KBAIER-HACHEMI, H. et al. (2012) In vitro growth kinetics, differentiation and morphological characterisation of Tunisian *Leishmania infantum* parasites. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.no. 106(1), 20-25.

KELLY, J.M. et al. (1991) Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol.no. 46, pp. 253-264.

KILLICK-KENDRICK, R. (1979) In: *Biology of Kinetoplastida*, vol II, LUMSDEN W.H.R. e EVANS D.A. (eds.) London New York: Academic Press.

KOUTINAS, A.F. et al. (2001) A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, vol.no. 98, pp. 247-261.

KWEIDER, M. et al. (1987) Infectivity of *Leishmania braziliensis* is dependent on the increasing expression of a 65,000 Dalton surface antigen. *Journal of Immunology*, vol.no. 138, pp. 299-305.

LAINSON, R. et al. (1987) Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol.no. 82(3), pp. 421-424.

LAMBSON, B. et al. (2002) Homologous minicircles in *Leishmania donovani*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.no. 96, pp-S60-S75.

- LAVERAN, A. e MESNIL, F. (1903) Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. et Mesn.), parasite d'une fièvre de l'Inde. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, vol. no. 137, pp. 957-961.
- LEWIS, M.D. et al. (2009) Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *International Journal for Parasitology*, vol.no. 39, pp. 1305-1317.
- MAIA, C. e CAMPINO, L. (2008) Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, vol.no. 158, pp. 274-287.
- MAIA, C. e CAMPINO, L. (2011) Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, vol.no. 27(8), pp. 341-344.
- MAIA, C. et al. (2006) Diagnóstico da leishmaniose canina pela técnica de PCR aplicada a sangue periférico em papéis de filtro. Resultados preliminares. *Veterinary Medicine*, vol.no. 47, pp. 29-33.
- MAIA, C. et al. (2009) Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*, vol.no. 179, pp. 142-144.
- MAIA, C. et al. (2010) Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology*, vol.no. 174, pp. 336-340.
- MAIA, C. et al. (2013) In vitro drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. *Experimental Parasitology*, vol.no. 135, pp. 36-41.
- MALLICK, S. et al. (2013) Chromone linked nitro derivative induces the expression of iNOS2 and Th1 cytokines but reduces the Th2 response in experimental visceral leishmaniasis. *International Immunopharmacology*, vol.no.15, pp. 772-779.
- MARR, J.J. (1991) Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol.no. 118, pp. 111-119.

- MAURÍCIO, I. et al. (1999) Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*, vol.no.119, pp. 237-246.
- MAURÍCIO, I. et al. (2006) Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *International Journal for Parasitology*, vol.no. 36(7), pp. 757-769.
- MCNEELY, T.B. TURCO, S.J. (1990) Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *The Journal of Immunology*, vol.no. 144, pp. 2475–2750.
- MELLO, G. (1997) *Probabilidades e Estatísticas, conceitos e métodos fundamentais II*. Escolar Editora, Portugal, p. 686.
- MICHALSKY, E. et al. (2007) Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary Parasitology*, vol.no. 147, pp. 67–76.
- MILES, A. M. et al. (2009) The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research in *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*, vol.no. 136(12), pp. 1509-28.
- MILLER, M.A. et al. (2000) Inducible Resistance to Oxidant Stress in the Protozoan *Leishmania chagasi*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.no. 275(43), pp. 33883-33889.
- MOREIRA, D. et al. (2012) Impact of Continuous Axenic Cultivation in *Leishmania infantum* Virulence. *PLoS neglected tropical diseases*, vol.no 6(1), pp. e1469.
- MURRAY, H.W. et al. (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet*, vol.no. 366, pp. 1561-1577.
- NELSON, D.J. et al. (1979) Allopurinol ribonucleoside as an antileishmanial agent. Biological effects, metabolism, and enzymatic phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.no. 254, pp. 11544-11549.

- NEOGY, A.B. et al. (1992) Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol.no. 47, pp. 772-777.
- NOLDER, D. et al. (2007) Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of mucocutaneous leishmaniasis. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.no. 76(3), pp. 573-578.
- NOYES, A.H. et al. (1996) Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.no. 55(1), pp. 98-105.
- NOYES, A.H. et al. (1998) A Nested-PCR-Based Schizodeme Method for Identifying *Leishmania* Kinetoplast Minicircle Classes Directly from Clinical Samples and Its Application to the Study of the Epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *Journal of Clinical Microbiology*, vol.no. 36(10), pp. 2877-2881.
- NWAKA, S. e HUDSON, A. (2006) Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nature Reviews*, vol.no. 5, pp. 941-955.
- ONLEISH (n.d.) Leishmaniose canina [WWW] Observatório Nacional das leishmanioses. Available from: <http://www.onleish.org/index.php?article=27&visual=3> [Accessed 02/05/13]
- OSMAN, O. et al. (1997) Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, vol.no. 35, pp. 2454-2457.
- OWH (2012) What is post kala-azar dermal leishmaniasis? [WWW] OneWorld Health. Available from: <http://oneworldhealthblog.com/2012/06/13/what-is-post-kala-azar-dermal-leishmaniasis/> [Accessed 10/08/13]
- OZBEL, Y. et al. (2000) A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Tropica*, vol.no. 74, pp. 1-6.

- PEREIRA, A. (2002) *Guia Prático de Utilização do SPSS. Análise de dados para ciências sociais e psicologia*. 3ª Ed. Edições Sílabo, Lisboa, pp. 140-181.
- PIRES, C. (2000) *Os flebótomos (Diptera, Psychodidae) dos focos zoonóticos de Leishmanioses em Portugal*. Tese. Universidade Nova de Lisboa, pp. 228.
- POLI, A. et al. (2002) Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Veterinary Parasitology*, vol.no. 106, pp. 181-191.
- PRATLONG, F. et al (2004) Isoenzymatic Analysis of 712 Strains of *Leishmania infantum* in the South of France and Relationship of Enzymatic Polymorphism to Clinical and Epidemiological Features. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. no. 42(9), pp. 4077-4082.
- QUINNELL, R.J. e COURTENAY, O. (2009) Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, vol.no. 136(14), pp. 1915-1934.
- RAMOS, A. e FARINHOTE, A.A.C. (1952) Contribuição para o conhecimento do Kala-Azar em Portugal. *Anais do Instituto de Medicina Tropical*, vol.no.2, pp. 1485-1500.
- RAVEL, C. et al. (2006). First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *International journal for Parasitology*, vol.no. 36, pp. 1383-1388.
- RIOUX, J.A. et al. (1990) Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, vol. no. 65, pp. 111-125.
- ROLÃO, N. et al. (2005) Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, vol.no. 12, pp. 183-186.
- RONDON, F.C.M. et al. (2012) *In vitro* efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, vol.no. 21(3), pp. 185-191.

- ROSS, R. (1903) Notes on the bodies recently described by Leishman and Donovan, *British Medical Journal*, pp. 1261-1262.
- RUIZ-FONS, F. et al. (2013) *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004-2010. *Euro surveillance*, vol.no. 18(30), pp. 20541.
- RYCKER M.D. et al. (2013) Comparison of a High-Throughput High-Content Intracellular *Leishmania donovani* Assay with an Axenic Amastigote Assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol.no. 57(7), pp. 2913-2922.
- SACKS, D. e PERKINS, P. (1984) Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*, vol.no. 223, pp. 1417-1419.
- SÁDLOVÁ, J. e VOLF, P. (1999) Occurrence of *Leishmania major* in sandfly urine. *Parasitology*, vol.no. 118, pp. 455-460.
- SCHÖNIAN, G. et al. (2001) Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol.no.95, pp. 217-224.
- SCHÖNIAN, G. et al. (2003) PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol.no. 47, pp. 349-358.
- SCHÖNIAN, G. et al. (2008) Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends in Parasitology*, vol.no. 24(3), pp. 135-142.
- SCHÖNIAN, G. et al. (2010) Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology*, vol.no. 138(4), pp. 405-425.
- SCHWENKENBECHER, J.M. et al. (2006) Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *International Journal for Parasitology*, vol.no. 36(2), pp. 237-246.

- SERGEANT, E. et al. (1921) Transmission du clou de Biskra par le phlebotome (P. papatasi Scop.), *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, vol. no.173, pp. 1030–1032.
- SERRADA, E. (2010) *A leishmaniose visceral em Portugal continental (1999-2009)*. Trabalho de projecto. Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade Nova de Lisboa.
- SIMPSON, L. et al. (1987) Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, vol.no. 262, pp. 6182-6196.
- SHAHANE, V. (n.d.) Parasitology *Leishmania* [WWW] Varsha Shahane. Available from: http://vdshahane.hpage.co.in/gallery23627_2.html [Accessed 05/04/2013]
- SMYTH, A.J. et al. (1992) Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology*, vol.no. 105, pp. 183-192.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. (2001) Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology*, vol.no. 39, pp. 560-563.
- STILES, J.K. et al. (1999) Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol.no. 93(8), pp. 781-807.
- STRAUSS-AYALI, D. et al. (2004) Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of infectious diseases*, vol.no. 189, pp. 1729–1733.
- TIBAYRENC, M. e AYALA, F.J. (1999) Evolutionary genetics of *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Microbes and Infection*, vol.no. 1(6), pp. 465-472.
- TIBAYRENC, M. et al. (1990) A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, vol.no. 87, pp. 2414-2418.

TITUS, R.G. & RIBEIRO, J.M. (1988) Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science*, vol.no. 239(4845), pp. 1306-1308.

TRITRYP PORTAL (n.d.) [WWW] Software.iar.res.in. Available from: <http://software.iar.res.in/tritryp/leishmania.php> [Accessed 05/04/2013]

VAN EYS, G. et al. (1992) Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol.no. 51(1), pp. 133-142.

VICTOIR, K. e DUJARDIN, J.C. (2002) How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. *Trends in Parasitology*, vol.no. 18(2), pp. 81-85.

VIOLI, S. (2010) *Leishmania* [WWW] Leishmania.org.it. Available from: http://www.leishmania.it/?page_id=6 [Accessed 05/04/2013]

VOLF, P. et al. (2007) Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *International Journal for Parasitology*, vol.no. 37, pp. 589-593.

VÖRHINGER, H.F. et al. (1990) Pharmakologische Untersuchungen mit Pentamidin-Aerosol bei HIV-Patienten. *Medizinische Klinik*, vol.no. 85(2), pp. 248-250.

WILLIAMS, C. et al. (2003) Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. *Journal of Microbiology Methods*, vol.no. 55, pp. 813-816.

WILSON, M.E. et al. (1994) Response of *Leishmania chagasi* Promastigotes to Oxidant Stress. *Infection and Immunity*, vol.no. 62 (11), pp. 5133-5141.

WILSON, R. (n.d.) Bird Wild life photography [WWW] raywilsonbirdphotography.co.uk. Available from:

http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.html [Accessed 05/04/2013]

WONG, I.L.K. et al. (2012) Flavonoid Dimers as Novel, Potent Antileishmanial Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol.no. 55, pp. 8891-8902.

WHO (2010a) *Control of the leishmaniasis*, World health organization, Technical Report Series no. 949.

WHO (2010b) Distribution os visceral leishmaniasis, worldwide, 2009 [WWW] World Health Organization. Available from: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_leishmaniasis_visceral_2009.png [Accessed 08/08/13]

WHO (2010c) Distribution os visceral leishmaniasis, worldwide, 2009 [WWW] World Health Organization. Available from: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_leishmaniasis_cutaneous_2009.png [Accessed 08/08/13]

YURCHENKO, V.Y. et al. (1999) Structure of *Leishmania* minicircle kinetoplast DNA classes. *Journal of Clinical Microbiology*, vol.no. 37, pp. 1656-1657.

ZAMBRANO-VILLA, S. et al. (2002) How protozoan parasites evade the immune response. *Trends in Parasitology*, vol.no. 18, pp. 272-278.

Anexo 1

Tabela 1 – Padrões originados pelos fragmentos de restrição obtidos com cada endonuclease (Adaptado de: Cortes et al, 2006).

Endonucleases	<i>BglII</i>		<i>ScrFI</i>			<i>DdeI</i>			<i>HpaII</i>				<i>RsaI</i>			<i>VspI</i>		
Padrões	I	II	I	II	III	I	II	III	I	II	III	IV	I	II	III	I	II	III
	447	258	411	288	447	319	419	240	410	287	447	350	253	210	253	160	170	310
Fragmentos de restrição (pb)		189	36	123		100	28	179	37	123		60	194	197	146	150	137	137
				36		28		28		37		37		40	48	137	90	
																	50	

Pb, pares de bases

Tabela 2 – Genótipos de restrição obtidos (Adaptado de: Cortes et al, 2006).

Perfis	Padrões originados pelos fragmentos de restrição					
	<i>BglII</i>	<i>ScrFI</i>	<i>DdeI</i>	<i>HpaII</i>	<i>RsaI</i>	<i>VspI</i>
A	II	I	II	I	I	I
B	I	I	I	I	I	I

